

Bestimmung der Primärstruktur des Proteins S 13
aus Escherichia Coli Ribosomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Harald Lindemann
aus Berlin

1976

Berlin 1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Bestimmung der Primärstruktur des Proteins S 13
aus Escherichia Coli Ribosomen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Harald Lindemann
aus Berlin

Berlin 1977

1. Gutachter : Prof. Dr. H.-G. Wittmann

2. Gutachter : Prof. Dr. W. Laskowski

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember und 20. Dezember 1976



INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung

1. Allgemeiner Aufbau des Ribosoms
2. Funktion des Ribosoms von *Escherichia coli*

B. Material und Methoden

I. Proteinisolierung

1. Trennung des Proteingemischs auf Sephadex G 100
2. Trennung des Proteingemischs auf Phosphorzellulose
3. Nachweis der Proteine
4. Identifizierung der Proteine und Reinheitskontrolle
5. Bestimmung des Molekulargewichts von S13

II. Primärstrukturaufklärung

1. Aminosäurezusammensetzung von S13
 - 1.1. Totalhydrolysen von S13
 - 1.2. Nachweis von Cystein
 - 1.3. Nachweis von Tryptophan
 - 1.4. Aminosäuren-Analysator
2. Chemische Spaltungsmethoden
 - 2.1. Spaltung mit BNPS-Skatol
 - 2.2. Spaltung mit Bromcyan
3. Enzymatische Spaltungsmethoden
 - 3.1. Spaltung mit TPCK-Trypsin
 - 3.2. Blockierung der Argininreste mit Cyclohexandion
 - 3.3. Spaltung mit *Staphylococcus aureus* Protease
 - 3.4. Spaltung mit Thermolysin
 - 3.5. Spaltung mit Chymotrypsin
 - 3.6. Spaltung mit Carboxypeptidasen
 - 3.6.1. Carboxypeptidasen A und B
 - 3.6.2. Carboxypeptidase C
4. Trennung der Peptide
 - 4.1. Trennung auf Sulfoäthylzellulose
 - 4.2. Trennung auf Sephadex G 50
 - 4.3. Trennung auf Dowex M71
 - 4.4. Trennung durch Dünnschichtchromatographie
 - 4.5. Trennung durch Dünnschichtelektrophorese
 - 4.6. Trennung mit der Peptidkarten-Technik
5. Nachweis der Peptide
6. Elution der Peptide von Dünnschichtplatten

7. Sequenzierung der Peptide

7.1. Bestimmung der N-terminalen Aminosäure durch Dansylierung

7.2. Dansyl-Edman-Abbau

7.3. Festphasen-Peptidsequenator

7.4. Proteinsequenator

C. Ergebnisse

1. Isolierung von S13

2. Aminosäurezusammensetzung von S13

3. Molekulargewicht von S13

4. Spaltung mit BNPS-Skatol

5. Spaltung mit Bromcyan

6. Spaltung mit TPCK-Trypsin

6.1. Peptidkarte der tryptischen Peptide

6.2. Trennung der tryptischen Peptide

6.3. Sequenzierung der tryptischen Peptide

6.4. Tryptische Spaltung nach Blockierung der Argininreste

7. Spaltung mit Staphylococcus aureus Protease

7.1. Peptidkarte der Peptide

7.2. Trennung der Peptide

7.3. Sequenzierung der Peptide

8. Spaltung mit Thermolysin

8.1. Peptidkarte der Thermolysin-Peptide

8.2. Trennung der Peptide

8.3. Sequenzierung der Peptide

9. Spaltung mit Chymotrypsin

9.1. Peptidkarte der chymotryptischen Peptide

10. Spaltung mit Carboxypeptidasen

10.1. Spaltung mit Carboxypeptidasen A und B

10.2. Spaltung mit Carboxypeptidase C

11. Gesamtsequenz des Proteins S13

12. Aussagen über die Sekundärstruktur von S13

13. Sequenzvergleich mit anderen ribosomalen Proteinen

D. Diskussion

1. Proteinsequenz

2. Topographie

3. Funktionelle Aspekte

E. Zusammenfassung

F. Literaturverzeichnis

G. Anmerkungen

H. Lebenslauf

A. Einleitung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Primärstruktur des Proteins S13 von der kleinen ribosomalen Untereinheit des Darmbakteriums *Escherichia coli* aufzuklären.

Das Protein S13 ist eines von insgesamt 54 verschiedenen Proteinen, aus denen das Ribosom von *E. coli* neben den drei verschiedenen rRNS-Molekülen besteht.

Das Ribosom ist das Zellorganell, an dem die Synthese eines Proteins aus den 20 verschiedenen Aminosäuren entsprechend der Information stattfindet, die in Form einer spezifischen Basensequenz in der Messenger-RNS festgelegt ist. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet.

Das Ribosom zerfällt bei Verminderung der Mg^{++} -Konzentration reversibel in zwei Untereinheiten, eine kleine und eine größere. Das Protein S13 ist in der kleinen ribosomalen Untereinheit neben 20 anderen Proteinen und einem Molekül ribosomaler RNS mit einer Sedimentationskonstante von 16S enthalten. Bisher sind schon 8 Proteine der kleinen Untereinheit und 11 von der größeren Untereinheit sequenziert und publiziert worden, und die Sequenz einer Reihe weiterer Proteine wird noch untersucht.

Der Sinn dieser Untersuchungen liegt darin, die Voraussetzung für ein detailliertes Verständnis der Funktion des Ribosoms sowie seiner Struktur und seiner Eigenschaften zu schaffen. Darüber hinaus ermöglicht der Vergleich der Proteinsequenzen, Homologien zwischen den verschiedenen *E. coli* Ribosomenproteinen festzustellen und Ähnlichkeiten mit ribosomalen Proteinen aus anderen Organismen aufzuzeigen.

Da die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Aminosäuresequenz später zusammen mit anderen Ergebnissen über die Ribosomenstruktur und -funktion diskutiert werden soll, ist es sinnvoll, zunächst kurz den generellen Aufbau und die Funktion des Ribosoms zu skizzieren.

1. Allgemeiner Aufbau des Ribosoms

Das Ribosom als derjenige Zellbestandteil, an dem die Proteinbiosynthese auf der Stufe der Translation stattfindet, ist sowohl in Prokaryonten (einschließlich Mitochondrien und Plastiden) als auch in Eukaryonten vorhanden. Trotz großer Übereinstimmungen in der Funktion gibt es strukturelle Unterschiede zwischen den Ribosomen der Prokaryonten und Eukaryonten (siehe Tabelle 1).

Im Rahmen dieser Arbeit werden wir uns ausschließlich mit dem Ribosom der Prokaryonten, speziell mit dem des Darmbakteriums *Escherichia coli*, beschäftigen.

Tabelle 1: Vergleich der Ribosomen von Pro- und Eukaryonten

	Prokaryonten	Eukaryonten
Monomer	70S	80S
Mol.Gew.	$2,7 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$
Größe (Å)	400x200x135	230 x 120
Zahl der Proteine	55	ca. 70
rRNS-Moleküle	23S, 16S, 5S	28S, 18S, 5,8S, 5S
Proteingehalt	37%	60%
Große Untereinheit	50S	60S
Mol.Gew.	$1,8 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$
Größe (Å)	130x170x260	230 x 170
Zahl der Proteine	34	ca. 31
rRNS-Moleküle	23S, 5S	28S, 5S, 5,8S
Mol.Gew. rRNS	$1,1 \times 10^6$ $0,04 \times 10^6$	$1,4-1,7 \times 10^6$ $0,04 \times 10^6$; -
Zahl der Nukleotide	3.200 ; 120	ca. 4.500 ; 120 ; -
Kleine Untereinheit	30S	40S
Mol.Gew.	$0,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
Größe (Å)	55x220x220	230x140x115
Zahl der Proteine	21	ca. 40
rRNS-Moleküle	16S	18S
Mol.Gew. rRNS	$0,55 \times 10^6$	$0,7-0,8 \times 10^6$
Zahl der Nukleotide	1.600	ca. 2.400

2. Funktion des Ribosoms von Escherichia coli

Wie bereits erwähnt, besteht die Funktion des Ribosoms in der Biosynthese von Proteinen. Bei der Proteinbiosynthese unterscheidet man drei Phasen: die Initiation (Synthese-Start), die Elongation (fortlaufende Synthese) und die Termination (Synthese-Stop) (siehe Schema).

Bei der Initiation bildet sich ein Komplex aus einer ribosomalen 30S Untereinheit, den drei Initiationsfaktoren IF-1, IF-2 und IF-3 sowie einem Molekül Messenger-RNS. Entsprechend dem Startcodon AUG auf der Messenger-RNS wird die mit der Aminosäure Formylmethionin beladene Transfer-RNS an einer der beiden ribosomalen Transfer-RNS-Bindungsstellen, der sogenannten Peptidyl- oder Donor-Stelle, gebunden unter gleichzeitiger Bindung eines Moleküls GTP und Dissoziation des Initiationsfaktors IF-3. Es liegt damit der 30S Initiationskomplex vor, der dann unter Anlagerung einer 50S Untereinheit und gleichzeitiger Freisetzung des Initiationsfaktors IF-1 in den 70S Initiationskomplex übergeht. Dann wird das GTP zu GDP + P_i hydrolysiert und der Initiationsfaktor IF-2 und GDP werden freigesetzt.

Im Verlauf der sich nun anschließenden Elongation wird zunächst ein ternärer Komplex aus dem Elongationsfaktor Tu (EF-Tu), einem Molekül GTP und der dem nächsten Codon auf der Messenger-RNS entsprechenden Aminoacyl-Transfer-RNS gebildet, und dieser wird an der zweiten ribosomalen Transfer-RNS-Bindungsstelle, der Akzeptor-Stelle, gebunden. Dann wird das GTP hydrolysiert, und der Komplex aus EF-Tu und GDP und das abgespaltene Orthophosphat werden freigesetzt. Mit Hilfe der katalytischen Wirkung der Peptidyltransferase, die in der 50S Untereinheit lokalisiert ist, wird nun die Peptidbindung zwischen dem Carboxylende der ersten Aminosäure (Formyl-

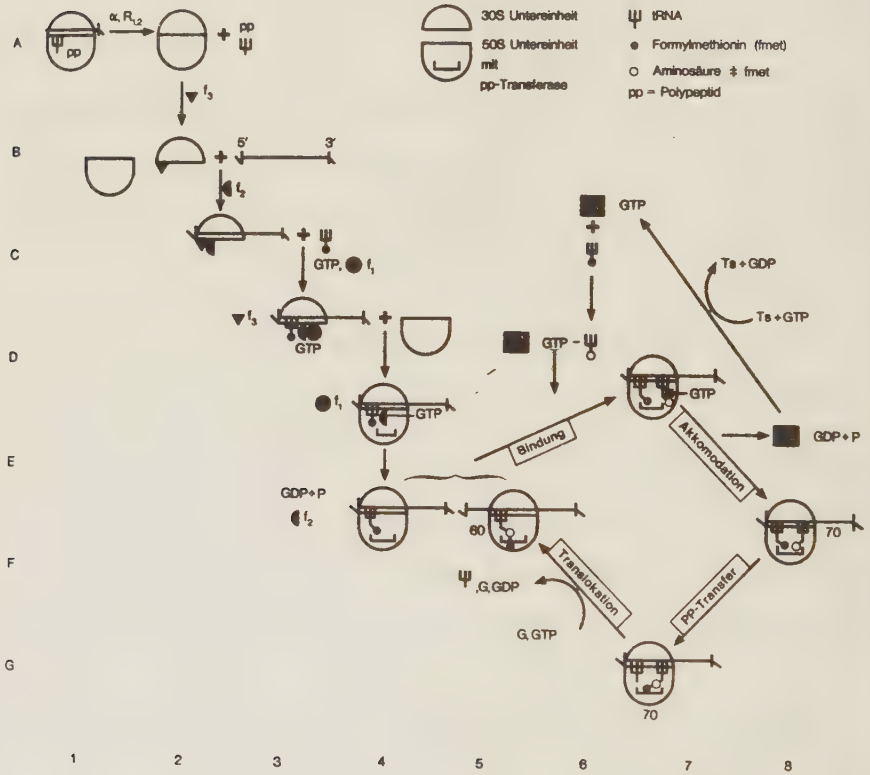
methionin) und dem Aminoende der zweiten Aminosäure hergestellt. Dabei wird gleichzeitig der Peptidylrest (in diesem Fall nur Formylmethionin) von der Transfer-RNS in der Peptidyl-Stelle auf die Transfer-RNS in der Akzeptor-Stelle übertragen, und die nun unbeladene Transfer-RNS verläßt die Peptidyl-Stelle. Unter der Mitwirkung des Elongationsfaktors G (EF-G) und durch GTP-Hydrolyse wird die mit dem wachsenden Peptid beladene Transfer-RNS von der Akzeptor-Stelle in die Peptidyl-Stelle transloziert. Damit kann eine erneute Bindung eines Komplexes aus EF-Tu, GTP und Aminoacyl-Transfer-RNS in der Akzeptor-Stelle erfolgen und der Elongationszyklus fortgesetzt werden.

Beendet wird der Elongationszyklus, wenn auf der Messenger-RNS ein Nonsense- oder Stopcodon (UAA, UGA, UAG) vorliegt (Termination). Zu diesen Codonen existieren keine entsprechenden Aminoacyl-Transfer-RNS Moleküle. Die Polypeptidsynthese endet daher, und mit Hilfe von Entlassungsfaktoren (Release-Faktoren) wird das Ribosom von der Messenger-RNS getrennt, wobei das Polypeptid und die Transfer-RNS freigesetzt werden. Unter Bindung von Initiationsfaktor IF-3 zerfällt das Ribosom wieder in seine zwei Untereinheiten. Diese stehen dann für eine erneute Initiation zur Verfügung. Der gesamte Reaktionsablauf bei der Translation ist nochmals in dem folgenden Schema wiedergegeben.

Welche Rolle das Protein S13 im Rahmen dieser Funktionsabläufe spielt, wird Gegenstand der Diskussion am Ende dieser Arbeit sein.

Schematische Darstellung der Translation

(nach Nierhaus und Weber, 1972)



B. Material und Methoden

I. Proteinisolierung

Das zu untersuchende Protein S13 war zum Teil in einem Gemisch von zwei bis vier Proteinen enthalten. Allerdings enthielt das Gemisch oft nur die Proteine S9 und S18 in geringer Menge (etwa 5% Verunreinigung), und es konnte daher ohne weiteres verwendet werden. Falls die Zahl und die Menge der Proteine in dem Gemisch zu groß waren, erfolgte eine Nachreinigung mit den aufgeführten Methoden:

1. Trennung des Proteingemischs auf Sephadex G 100

Das Proteingemisch wurde in 10 ml 15%iger Essigsäure gelöst und auf eine mit Sephadex G 100 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) gefüllte Säule mit den Maßen 270 x 3 cm aufgetragen. Fraktionen mit einem Volumen von 7,0 ml wurden mit einem LKB Ultrarac Fraktionssammler (LKB Produkter, Bromma, Schweden) gesammelt. Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 25 ml/h bei einem hydrostatischen Druck von 1 m .

2. Trennung des Proteingemischs auf Phosphorzellulose

Etwa 24 mg Proteingemisch wurden in 6 ml Puffer aus 6 M Harnstoff, 0,012 M Methylamin und 0,05 M NaH_2PO_4 , pH 5,8 , gelöst und auf eine Phosphorzellulose-Säule (Mannex-P, Standardkapazität 0,88 meq/g, Mann Research Laboratory, New York, N.Y., USA) mit den Maßen 59 x 2 cm aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 45 ml/h bei einem hydrostatischen Druck von 0,5 m. Fraktionen mit einem Volumen von 4,4 ml wurden mit einem LKB RadiRac Fraktionssammler aufgefangen.

Die Elution geschah mit den folgenden Puffern (pH 5,8):

a) 25 ml Puffer aus 6 M Harnstoff, 0,012 M Methylamin, 0,05 M NaH_2PO_4

b) 5,0 l Gradient aus je 2,5 l der Puffer aus

6 M Harnstoff, 0,012 M Methylamin, 0,05 M NaH_2PO_4 , 0,1 M NaCl

6 M Harnstoff, 0,012 M Methylamin, 0,05 M NaH_2PO_4 , 0,6 M NaCl.

3. Nachweis der Proteine

Der Nachweis der Proteine in den Fraktionen der Säulenchromatographie geschah mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Bei der Trennung über Sephadex G 100 wurden aus jeder 4. Fraktion 0,8 ml (ca. 10%) entnommen, gegen H_2O bidest (versetzt mit 0,1 % B-Mercaptoäthanol) dialysiert, dann in Spitzkolben überführt und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Rotavapor R ; Büchi, Flawil, Schweiz) eingedampft. Die so vorbereiteten Proben wurden in je 0,2 ml Obergel (2,5 % Acrylamid, 8 M Harnstoff) gelöst und auf ein Gel aus 15% Acrylamid und 6 M Harnstoff gegeben.

Der Trennungsvorgang lief über 4 h bei einer Spannung von 90 V. Als Elektrophorese-Puffer diente ein Puffer aus Glycin und Essigsäure (14,1 g Glycin, 1,53 ml Essigsäure mit H_2O bidest auf 1,0 l).

Die Proteinbanden im Gel wurden sichtbar gemacht durch Eintauchen der Polyacrylamidgele in ein Färbepad aus 5,5 g/l Amidoschwarz 10 B (Merck, Darmstadt) in 7%iger Essigsäure. Die Entfärbung geschah in fließendem Leitungswasser. Die Proteine in den Gelen waren schließlich als scharfe Banden sichtbar, und die Fraktionen konnten entsprechend ihres Proteingehalts vereinigt werden.

Bei der Trennung der Proteine über Phosphorzellulose wurde lediglich die Extinktion in den Fraktionen bei 230 nm gemessen und die Fraktionen dann entsprechend den sich ergebenden Elutionsprofilen vereinigt.

4. Identifizierung der Proteine und Reinheitskontrolle

Identifiziert wurden die Proteine mit der zweidimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach der Methode von Kaltschmidt und Wittmann (1970). Mit dieser Methode wurde auch die Reinheit des Proteins S13 festgestellt, wobei eine Verunreinigung mit den Proteinen S9 und/oder S18 von insgesamt 5% als vertretbar angesehen wurde.

5. Bestimmung des Molekulargewichts von S13

Das Molekulargewicht des Proteins S13 wurde mit der SDS- (Natrium-dodecylsulphat-) Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach der Methode von Weber und Osborn (1969) bestimmt. Als Eichsubstanzen dienten Cytochrom c (Pferdeherz) und Myoglobin (Wal).

II. Primärstrukturaufklärung

Der N-terminale Bereich des ungespaltenen ribosomalen Proteins S13 konnte mit Hilfe eines automatisierten Edman-Abbaus sequenziert werden (Wittmann-Liebold, 1973a). Dazu wurde ein verbesserter Beckman Proteinsequenator (Beckman Instruments, München) verwendet. Um die Primärstruktur des gesamten Proteins aufzuklären, mußten verschiedene chemische und enzymatische Methoden zur Proteinspaltung angewandt werden. Nur durch die Sequenzierung einander überlappender Peptide war es möglich, die genaue Aminosäuresequenz des Proteins S13 zu bestimmen.

Um einen Überblick über die Bruttozusammensetzung des Proteins zu gewinnen, wurden Totalhydrolysen durchgeführt und verschiedene Reagenzien zur Bestimmung spezieller Aminosäuren verwendet.

1. Aminosäurezusammensetzung von S13

1.1. Totalhydrolysen von S13

Das Protein (ca. 5 nM) wurde in ein speziell gereinigtes Reagenzglas gefüllt und dazu 0,2 ml 5,7 N HCl gegeben, zu dem 0,02 % β -Mercaptoäthanol zum Schutz vor Oxidation durch Sauerstoff hinzugefügt wurde. Nach gründlichem Spülen mit Stickstoff wurde das Glas unter Wasserstrahlpumpen-Vakuum abgeschmolzen und für 20 h, 48 h oder 65 h bei 110°C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurden die Gläser geöffnet und die Proben im Exsikkator über NaOH-Plättchen im Vakuum getrocknet. Die trockenen Proben wurden in pH 2,2-Puffer gelöst (1,96 g Natriumcitrat, 1,7 ml HCl, 2 ml Thiodiglycol, 0,1 ml Caprylsäure; auf 1 l) und auf den Aminosäureanalysator aufgetragen.

1.2. Nachweis von Cystein

Cystein erscheint im Eluat der Ionenaustauschersäule der Aminosäurenanalysatoren nur als Dimeres Cystin und ergibt im Elutionsprofil einen sehr breiten, flachen Gipfel vor dem Valin-Gipfel, der sich nicht gut auswerten läßt. Daher war es notwendig, eventuell vorhandenes Cystein zur Cysteinsäure aufzuoxidieren, die als scharfer Gipfel vor dem Asparaginsäure-Gipfel erscheint. Die Oxidation wurde nach der Methode von Hirs (1956) mit Perameisensäure durchgeführt. Dazu wurden 9 ml 88%ige Ameisensäure und 1 ml 30%ige Wasserstoffperoxyd-Lösung gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde das Gemisch auf -15°C abgekühlt (Perameisensäure). Das Protein wurde in 0,1 ml 88%ige Ameisensäure gelöst, dann wurden 0,05 ml der gekühlten Perameisensäure dazugegeben und bei 0°C im Eisbad für 4 h inkubiert. Danach wurde mit dem 8-fachen Volumen Wasser verdünnt, die Probe eingefroren und lyophilisiert. Die trockene Probe wurde in 0,2 ml 5,7 N HCl (ohne B-Mercaptoäthanol) gelöst, in ein speziell gereinigtes Reagenzglas überführt, ohne Vakuum abgeschmolzen und für 20 h bei 110°C hydrolysiert.

1.3. Nachweis von Tryptophan

Zum Nachweis von Tryptophan wurden vier verschiedene Methoden verwendet; bei der normalen Hydrolyse mit 5,7 N HCl wird Tryptophan zerstört.

Daher wurden etwa 30 nM Protein mit 0,1 ml 4 M Methansulfonsäure, versetzt mit 0,2 % Tryptamin, für 24 h bei 115°C hydrolysiert.

Unter diesen Bedingungen ist Tryptophan stabil und kann auf dem Aminosäurenanalysator nachgewiesen werden. Dazu wurde die Probe nach der Hydrolyse mit pH 2,2-Puffer stark verdünnt (ca. 1:10) und ein entsprechender Teil auf den Aminosäurenanalysator aufgetragen. Als weitere Methode zum Nachweis von Tryptophan wurde die Extinktion des Proteins, gelöst in 0,1 N NaOH, in verschiedenen Konzentrationen bei 280 nm und bei 294 nm gemessen. Unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes konnte aus den gemessenen Extinktionswerten, den Extinktionskoeffizienten für Tyrosin und Tryptophan und der Schichtdicke die Zahl der Tryptophanreste im Protein bestimmt werden (Methode nach Goodwin und Morton, 1946).

Schließlich wurde noch eine Peptidkarte mit den tryptischen Peptiden von S13 mit Ehrlich-Reagenz gefärbt (p-Dimethylaminobenzaldehyd/HCl) um auf diese Weise ein tryptophanhaltiges Peptid nachzuweisen. Ein weiterer Nachweis für Tryptophan liegt in der Behandlung des Proteins mit BNPS-Skatol vor, das Proteine spezifisch am Tryptophanrest spaltet (Einzelheiten im Kapitel B.II.2.1.).

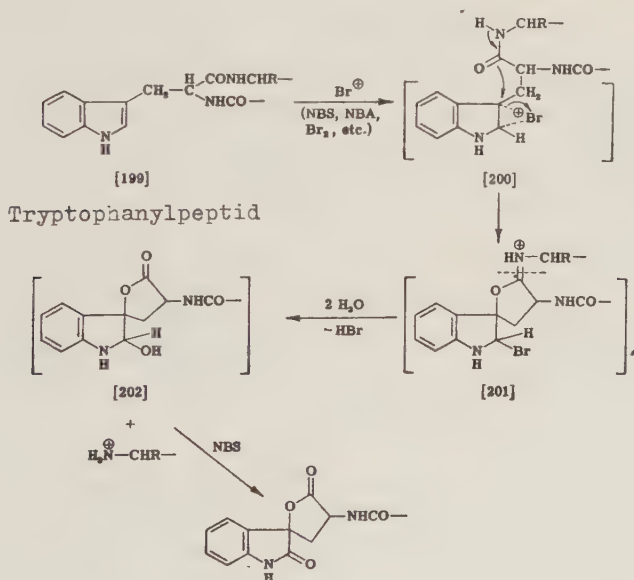
1.4. Aminosäuren-Analysator

Die Aminosäurenanalysen wurden auf folgenden Geräten durchgeführt: Anfangs wurde ein Beckman Unichrom Analysator benutzt (Beckman Instruments, München); später wurde mit einem LKB Biocal 3201 Analysator (LKB Produkter; Bromma, Schweden) und vorwiegend mit einem Durrum D 500 Analysator (Durrum Instrument Corp.; Palo Alto, USA) gearbeitet. Alle drei Geräte liefen im Einsäulen-Verfahren mit stufenweiser Elution der Aminosäuren unter Verwendung von drei verschiedenen Puffern.

2. Chemische Spaltungsmethoden

2.1. Spaltung mit BNPS-Skatol

BNPS-Skatol (3-Brom-3 methyl-2-(2 nitrophenylthio)indolenin) (Fontana,1972) spaltet Tryptophanyl-Peptidbindungen spezifisch mit einer Ausbeute von bis zu 65%. Der Reaktionsmechanismus ist folgender (nach Spande et al.,1970):

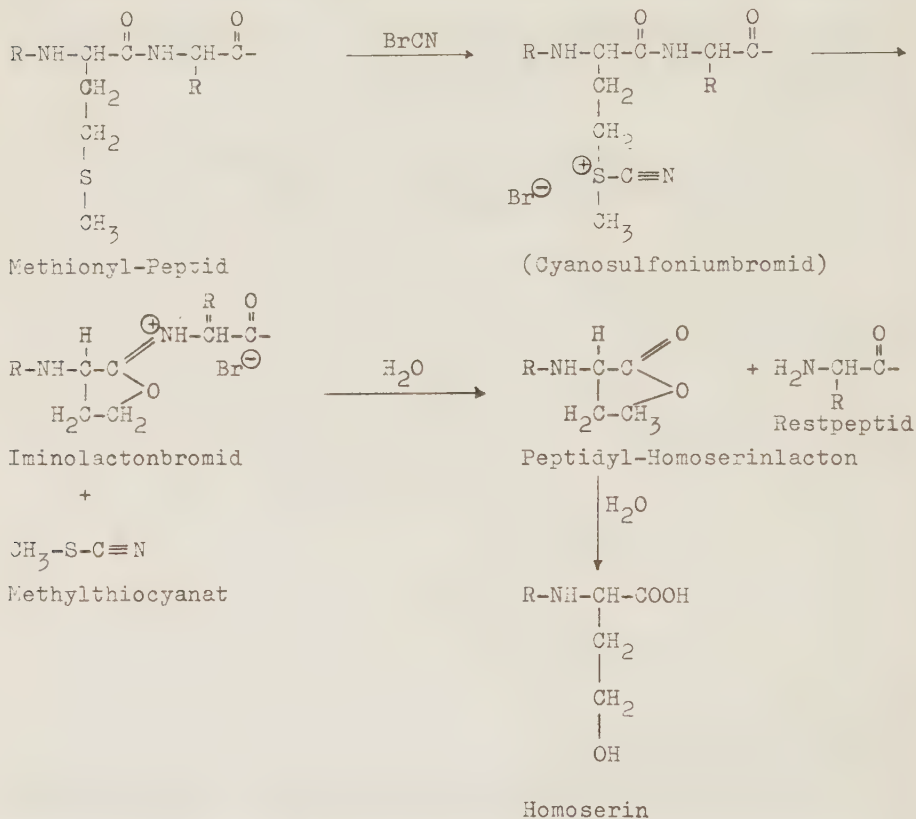


Versuchsdurchführung:

1,3 mg BNPS-Skatol (Pierce, Rockford, USA) wurden in 0,25 ml Äthanol gelöst, und dann wurden 0,25 ml 50%ige Essigsäure hinzugegeben (Lösung A). 1 mg Tyrosin wurde in 2,0 ml 50%ige Essigsäure gelöst (Lösung B). 0,4 mg Protein S13 wurden in 0,2 ml 50%ige Essigsäure gelöst (Lösung C). 0,2 ml der Lösung A, 0,4 ml von Lösung B und 0,2 ml von Lösung C wurden im Dunkeln für 48 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2. Spaltung mit Bromcyan

Die Reaktion von Bromcyan mit den Methionylresten im Protein führt zur Spaltung dieser Peptidbindungen (Gross, 1967). Die Reaktion verläuft nach dem folgenden Schema (nach Gross, 1967):



Das Protein wurde in 70%iger Ameisensäure gelöst und mit einem 500-fachen Überschuß an Bromcyan verse t. Die Inkubation lief über 18 h im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Verdünnen mit H₂O bidest und Lyophilisieren beendet.

3. Enzymatische Spaltungsmethoden

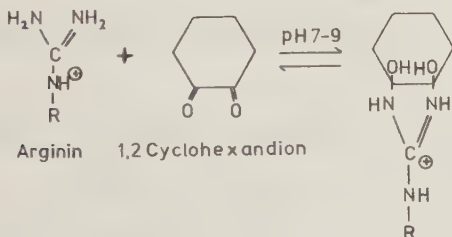
3.1. Spaltung mit TPCK-Trypsin

Zur Spaltung von S13 wurde Trypsin (aus Rinderpankreas), Systemnummer 3.4.21.4, behandelt mit N-Tosyl-L-phenylalanyl-chlormethan (TPCK) (Merck, Darmstadt) zur Beseitigung von chymotryptischer Nebenaktivität, verwendet.

16 mg S13 wurden in 10 ml H₂O bidest gelöst und der pH-Wert mit 0,05 %iger wäBriger Ammoniaklösung auf pH 7,8 eingestellt. 0,3 mg TPCK-Trypsin wurden in 0,2 ml H₂O bidest gelöst (pH 7,8) und zunächst nur die halbe Menge zur Proteinlösung zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde dann das restliche Enzym zum Reaktionsgemisch hinzugegeben und für weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Der pH-Wert im Reaktionsgemisch wurde von Zeit zu Zeit kontrolliert und auf pH 7,3 durch Zugabe von 0,05 %ige Ammoniaklösung gehalten. Die Reaktion wurde durch Einfrieren und Lyophilisieren beendet.

3.2. Blockierung der Argininreste mit Cyclohexandion

Mit Hilfe von 1,2-Cyclohexandion lassen sich Arginylreste im Protein reversibel modifizieren (Patthy und Smith, 1975). Der Reaktionsmechanismus ist folgender:



N^ε, N^ε - (1,2-dihydroxy cyclohex-1,2-ylen)

L - Arginin

Unterwirft man derart behandeltes Protein einer tryptischen Verdauung, so erhält man nur Spaltungen am Lysin.

Versuchsdurchführung:

7,5 mg S13 wurden in 1,3 ml 0,25 M Natriumborat-Puffer, pH 9,0 , gelöst und 17,4 mg 1,2-Cyclohexandion (Pierce, Rockford, USA) hinzugegeben. Inkubiert wurde für 2 h bei 35°C im Wasserbad. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 ml 30%iger Essigsäure beendet. Danach wurde 1:2 mit H₂O bidest verdünnt, gegen 1%ige Essigsäure bei 4°C dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Das trockene Protein wurde in 2,0 ml 0,1 M Natriumborat-Puffer, pH 8,0 , gelöst und 0,2 mg TPCK-Trypsin in 0,2 ml H₂O bidest zugegeben. Die tryptische Verdauung lief über 5 h bei 37°C. Dann wurde die Probe eingefroren und lyophilisiert.

Zur Deblockierung der Argininreste wurde das getrocknete Material in 2 ml 0,5 M Hydroxylamin, pH 7,0 , gelöst und unter Stickstoff für 7 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wiederum lyophilisiert.

3.3. Spaltung mit Staphylococcus aureus Protease

Staphylococcus aureus Protease ist ein extrazelluläres Enzym und spaltet unter bestimmten Bedingungen nur an der Carboxylgruppe von Glutaminsäureresten (Houmard und Drapeau, 1972). Das Enzym wurde uns freundlicherweise von Dr. G.R. Drapeau, Montreal, zur Verfügung gestellt.

13 mg S13 wurden in 2,5 ml 0,3%iger Essigsäure, pH 4,3 , gelöst. 0,4 mg Staphylococcus aureus Protease (in 0,5 ml 0,3%iger Essigsäure, pH 4,3 , gelöst) wurde zur Proteinlösung zugegeben. Inkubiert wurde für 18 h bei 37°C, und die Reaktion wurde durch Einfrieren und Lyophilisieren der Probe beendet.

3.4. Spaltung mit Thermolysin

Das Enzym Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko, Systemnummer 3.4.24.4 , stabilisiert mit ca. 35% Natrium- und Calciumacetat (Merck, Darmstadt), hydrolysiert Proteine und Peptide spezifisch am Aminoende von Leucin, Isoleucin, Valin und Phenylalanin. Es wurden 16 mg S13 in 2 ml H₂O bidest, pH 8,0 , gelöst und dazu 0,26 mg Thermolysin in 0,2 ml H₂O bidest, pH 8,0 , gegeben. Inkubiert wurde für 1 h bei 37°C, und dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 Tropfen 30%ige Essigsäure beendet. Die Probe wurde anschließend eingefroren und lyophilisiert.

3.5. Spaltung mit Chymotrypsin

d-Chymotrypsin (aus Rinderpankreas), Systemnummer 3.4.21.1 , (Merck, Darmstadt) hydrolysiert Proteine und Peptide vorwiegend am Carboxylende von Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und Leucin.

Zur Spaltung wurden etwa 0,3 mg S13 in 0,3 ml H₂O bidest, pH 8,0 , gelöst und 0,005 mg Chymotrypsin in 0,005 ml H₂O bidest, pH 8,0 , hinzugegeben. Inkubiert wurde für 1 h bei 37°C, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Tropfen 30%iger Essigsäure beendet. Dann wurde die Probe eingefroren und lyophilisiert.

3.6. Spaltung mit Carboxypeptidasen

Carboxypeptidasen sind Exopeptidasen, die das Protein vom C-terminalen Ende her stufenweise abbauen unter Abspaltung der C-terminalen Aminosäuren in der Reihenfolge ihres Auftretens in der Sequenz. Es gibt verschiedene Arten von Carboxypeptidasen, die sich in der Substratspezifität unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den Carboxypeptidasen A, B und C gearbeitet.

3.6.1. Carboxypeptidasen A und B

Carboxypeptidase A aus Rinderpankreas, Systemnummer 3.4.12.2 , behandelt mit Diisopropylphosphorfluoridat, (Merck, Darmstadt), spaltet C-terminale, nicht basische Aminosäuren von Proteinen und Peptiden ab. Carboxypeptidase B aus Schweinepankreas, Systemnummer 3.4.12.3 , behandelt mit Phenylmethansulfonylchlorid, (Merck, Darmstadt), spaltet C-terminales Lysin und Arginin von Proteinen und Peptiden ab.

Zur Untersuchung des C-terminalen Bereichs des Proteins S13 wurde ein Gemisch dieser beiden Enzyme angewendet. Dazu wurden 1,6 mg Protein in 0,1 ml Natriumboratpuffer, pH 8,0 , gelöst und 0,015 mg Carboxypeptidase A und 0,015 mg Carboxypeptidase B hinzugegeben. Zu verschiedenen Zeiten wurde je 1/10 des Ausgangsvolumens abgenommen und in je 0,1 ml 1%ige Trifluoressigsäure pipettiert (Reaktionsstop). Das enthaltene Protein wurde mit der 4,5-fachen Menge Aceton (gekühlt auf -15°C) ausgefällt (Inkubation 2 h bei 0°C) und abzentrifugiert (Acetonfällung nach Barritault et al., 1976). Die Überstände wurden getrocknet, in pH 2,2-Puffer aufgenommen und direkt auf den LKB Biocal 3201 Aminosäurenanalysator gegeben.

3.6.2. Carboxypeptidase C

Carboxypeptidase C aus Citrusblättern, Systemnummer 3.4.12.1 , (Boehringer, Mannheim), vereinigt in sich die Substratspezifitäten von Carboxypeptidase A und Carboxypeptidase B und spaltet zusätzlich auch Prolin ab (Tschesche und Kupfer, 1972).

3,5 mg B13 wurden in 0,23 ml Natriumcitrat-Puffer, pH 5,3 , gelöst und 0,7 mg Carboxypeptidase C in 0,1 ml Natriumcitrat-Puffer, pH 5,3, hinzugegeben. Als interner Standard waren vorher noch 20 nM Norleucin in 0,02 ml Natriumcitrat-Puffer, pH 5,3 , zugegeben worden. Wiederum wurden bei verschiedenen Zeiten Proben entnommen und in je 0,1 ml 1%ige Trifluoressigsäure pipettiert. Nach Ausfällung des Proteins mit Aceton (wie unter B.II.3.6.1. beschrieben) wurden die Proben getrocknet, in pH 2,2-Puffer aufgenommen und auf den Aminosäurenanalysator gegeben.

4. Trennung der Peptide

4.1. Trennung auf Sulfoäthylzellulose

Sulfoäthylzellulose (SE-Zellulose) ist ein Kationenaustauscher mit einer reaktiven Sulfonsäuregruppe, die über eine Äthylgruppe an die Zellulosematrix gebunden ist. Verwendet wurde SE-Zellulose mit einer Kapazität von 0,21 (Serva, Heidelberg).

Vorbereitung der SE-Zellulose:

Zuerst ließ man die SE-Zellulose in 20-fachem Volumen 0,5 N NaOH und 0,5 M NaCl für 30 Minuten quellen. Dann wurde über eine Fritte abgesaugt und mit 0,5 M NaCl gewaschen, bis der pH-Wert des Eluats neutral war. Anschließend wurde resuspendiert in 0,5 N HCl, etwa 10 Minuten gerührt, erneut abgesaugt und mit 0,5 M NaCl neutral gewaschen und schließlich zweimal mit Anfangspuffer gewaschen. Die feinen Partikel wurden abgeschlemmt, indem man die SE-Zellulose mehrmals in Anfangspuffer resuspendierte und jeweils nach 30 Minuten den Überstand dekantierte. Auf diese Weise konnte man die Gefahr einer Verstopfung der Säule durch Feinstpartikel entscheidend verringern. Schließlich wurde die SE-Zellulose am Wasserstrahlvakuum entlüftet und die Säule (Säulenmaße: 1,5 x 45 cm) unter einem Druck von 0,3 atü gefüllt.

Eluiert wurde die SE-Zellulose-Säule zunächst mit ca. 70 ml Anfangspuffer (0,01 M Pyridin/Ameisensäure, pH 2,7 ; Leitfähigkeit 0,98 mS), und dann wurde ein nichtlinearer Gradient angeschlossen. Dabei stiegen sowohl die Ionenstärke als auch der pH-Wert an (Wittmann-Liebold, 1971). Erzielt wurde dieser Gradient von einem

speziellen Gradientenmischgerät, genannt Varigrad, bestehend aus 8 linear miteinander verbundenen Gefäßen mit je 150 ml der folgenden Puffer:

1) 0,01 M Pyridin/Ameisensäure, pH 2,7 , Leitfähigkeit 0,98 mS	
2) 0,02 M " pH 2,8 " 1,42 mS	
3) 0,03 M " pH 3,0 " 1,77 mS	
4) 0,04 M " pH 3,1 " 2,18 mS	
5) 0,06 M " pH 3,3 " 2,82 mS	
6) 0,08 M " pH 3,5 " 3,52 mS	
7) 0,16 M " pH 4,1 " 5,88 mS	
8) 0,32 M " pH 4,5 " 8,86 mS	

Anschließend wurde weiter eluiert mit einem linearen Gradienten aus je 150 ml von Puffer Nr. 8 und einem Puffer aus 0,80 M Pyridin/Ameisensäure und zum Abschluß mit 0,2 N NaOH. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug etwa 30 ml/h, und es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 3,5 ml mit einem LKB RadiRac Fraktionssammler aufgefangen. Das Peptidgemisch wurde in Anfangspuffer (Puffer Nr.1) auf die Säule aufgetragen. Nach Abschluß der Elution wurden die oberen 5 cm der Säulenfüllung entnommen und mehrmals mit 70%iger Ameisensäure extrahiert, um so eventuell vorhandene schwer lösliche Peptide aus der SE-Zellulose herauszulösen.

4.2. Trennung auf Sephadex G 50

Zur Vortrennung der Peptide wurde meist eine Säulenchromatographie mit Sephadex G 50 (superfine) durchgeführt; Säulenmaße: 145 x 1 cm. Dabei wurden Fraktionen mit einem Volumen von bis zu 1 ml aufgefangen.

Aufgetragen und eluiert wurde mit 10%iger Essigsäure; die Durchflußgeschwindigkeit betrug etwa 3 ml/h.

In einem Fall wurde die Trennung der tryptischen Peptide auf Sephadex G 50 (fine) (Säulenmaße: 1,5 x 250 cm) durchgeführt. Die Elution geschah mit 15%iger Essigsäure bei einer Durchflußgeschwindigkeit von ca. 24 ml/h, und es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 2,8 ml aufgefangen.

Die Fraktionen wurden entsprechend ihres Gehalts an Peptiden vereinigt und dann, wenn nötig, auf Dowex M71 Ionenaustauscherharz nachgetrennt.

4.3. Trennung auf Dowex M71

Das Ionenaustauscherharz Dowex M71 (Beckman Instruments, München) ist ein starker Sulfonsäure-Kationenaustauscher, und seine Matrix besteht aus einem Kopolymeren von Styrol und Divinylbenzol (Quervernetzungsgrad 7%). Die kugelförmigen Harzpartikel haben einen Durchmesser von 0,008 - 0,040 mm. Das Trennungsvermögen dieses Ionenaustauschers ist größer als das der SE-Zellulose. Allerdings besteht auch die Gefahr, daß sehr stark basische Peptide irreversibel an das Harz binden und damit verlorengehen.

Es wurde mit einer sehr kleinen Säule (Maße: 0,2 x 10 cm) gearbeitet die außerdem mit einem Wassermantel zur Temperierung umgeben war (R.Chen, unveröffentlicht). Die Elution der Peptide geschah bei einer Säulentemperatur von 50°C mit den folgenden Puffern:

- 1) 0,1 M Pyridin/Ameisensäure, pH 2,7
- 2) 1,0 M " pH 3,5
- 3) 2,0 M " pH 5,0
- 4) 0,1 N NaOH

Aus den Puffern Nr. 1, 2 und 3 wurden lineare Gradienten hergestellt, die dem jeweiligen Trennungsproblem angepaßt waren. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von etwa 0,5 ml aufgefangen; die Durchflußgeschwindigkeit betrug ungefähr 5 ml/h. Regeneriert wurde das Ionenaustauscherharz mit 0,1 N NaOH und äquilibriert mit dem Anfangspuffer (Puffer Nr.1). Das Peptidgemisch wurde im Anfangspuffer auf die Säule aufgetragen.

4.4. Trennung durch Dünnschichtchromatographie

In vielen Fällen konnten die Peptide aus den Fraktionen des Sephadex G 50 (superfine)-Laufs direkt auf Zellulose-Dünnschichtplatten nachgereinigt werden. Dabei wurden folgende Dünnschichtplatten verwendet (alle im Format 20 x 20 cm):

- 1) Polygram Cel 300 Fertigfolien für die Dünnschichtchromatographie
Schicht: 0,1 mm Zellulose MN 300 (Macherey-Nagel; Düren)
- 2) Polygram Cel 400 Fertigfolien für die Dünnschichtchromatographie
Schicht: 0,1 mm Mikrokristalline Zellulose (Macherey-Nagel; Düren)
- 3) DC-Alufolien Cellulose, Schichtdicke 0,1 mm (Merck, Darmstadt).

Das Peptidgemisch wurde in möglichst geringem Volumen von 20%igem Pyridin gelöst und auf einer Länge von ca. 5 cm linienförmig auf der Platte aufgetragen. Es wurde aufsteigend chromatographiert in einem Puffer aus 250 ml Pyridin, 375 ml n-Butanol, 75 ml Essigsäure und 300 ml H₂O bidest („PBEW“) bis die Lösungsmittelfront den oberen Rand der Dünnschichtplatte erreicht hatte. Die Laufzeit

schwankte je nach Art der Dünnschichtplatte zwischen etwa 5 h und 10 h.

4.5. Trennung durch Dünnschichtelektrophorese

Bei Peptiden, die Methionin oder Cystein enthielten, wurde eine Dünnschichtelektrophorese auf Polygram Cel 300 oder Cel 400 durchgeführt. Dazu wurde die Probe ebenfalls in möglichst geringem Volumen Elektrophorese-Puffer, pH 4,4 (50 ml Pyridin, 100 ml Essigsäure, 375 ml Aceton und 1975 ml H₂O bidest), gelöst und auf ca. 5 cm linienförmig parallel zur Anode aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Dünnschicht-Elektrophoresekammer mit Wasserkühlung (Desaga, Heidelberg) bei 400 V und ca. 15 mA durchgeführt. Elektrophoresedauer: 2 h.

4.6. Trennung mit der Peptidkarten-Technik

Zur analytischen Trennung der von einer Proteinspaltung erhaltenen Peptide wurde die Peptidkarten-Technik (Fingerprint-Technik) angewandt. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus Dünnschicht-Elektrophorese und Dünnschichtchromatographie, die eine zweidimensionale Auftrennung der Peptide erlaubt.

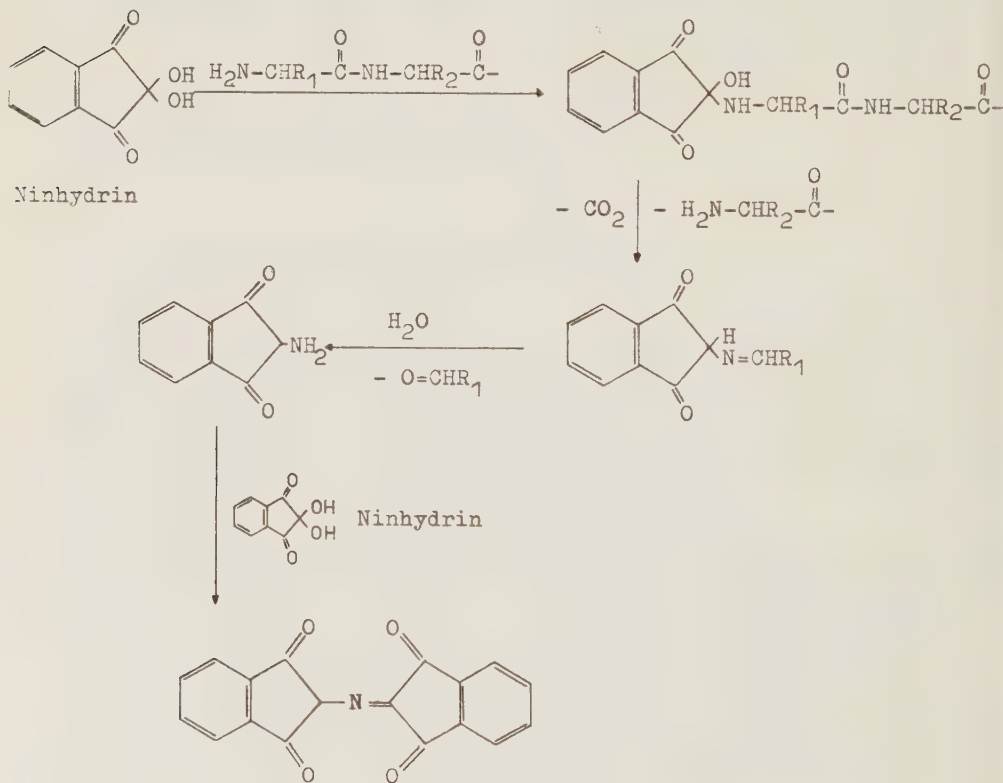
Es wurden Polygram Cel 300 und Cel 400 Dünnschichtplatten verwendet. Die Trennung in der 1. Dimension geschah auf elektrophoretischem Wege und die Trennung in der 2. Dimension durch aufsteigende Chromatographie im PBEW-System. In einer Reihe von Fällen wurden auch Peptidgemische aus Fraktionen eines Säulenlaufs mit Dowex M71 mit dieser Methode getrennt, wenn eine eindimensionale Trennung nicht ausreichte.

In der Regel wurden ca. 5 nM Peptidgemisch, gelöst in pH 4,4-Elektrophoresepuffer, in der Nähe der Anode punktförmig auf die mit Elektrophoresepuffer äquilibrierte Dünnschichtplatte aufgetragen. Elektrophoresedauer: 2 h bei 400 V und ca. 15 mA. Danach wurde die Platte getrocknet und in der 2. Dimension im PBEW-System chromatographiert.

Die Dünnschichtplatten waren folgendermaßen vorbehandelt worden: Die trockene Platte wurde mit dem Elektrophoresepuffer besprüht, bis sie gut durchgefeuchtet (nicht naß) war, dann in die Elektrophoresekammer eingelegt und für ca. 30 Minuten bei 400 V ohne Probe elektrophoretisiert.

5. Nachweis der Peptide

Nachgewiesen wurden die Peptide mittels Papier- oder Dünnschicht-chromatographie, da auf diese Weise auch eine Unterscheidung zwischen sauberen und Mischfraktionen möglich war. Sichtbar gemacht wurden die Peptide mit Ninhydrin-Reagenz (3 g Ninhydrin, 30 ml Collidin, 100 ml Essigsäure, 870 ml Äthanol). Ninhydrin reagiert mit der N-terminalen Aminosäure der Peptide unter Bildung eines gefärbten Komplexes nach folgendem Schema:



Bei der Ninhydrin-Reaktion wird also die N-terminale Aminosäure je nach Stärke der Besprühung mit der Reagenz-Lösung mehr oder weniger zerstört. Außerdem wird auch nicht N-terminales Lysin über seine ϵ -Aminogruppe angegriffen. Aus diesem Grund wurde gelegentlich auch mit einer mit Äthanol 1:1 verdünnten Ninhydrin-Lösung gearbeitet.

Bei dem SE-Zellulose-Säulenlauf wurde aus jeder 4. Fraktion 1/3 des Fraktionsvolumens entnommen, in speziell gereinigte Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer eingedampft. Die Proben wurden dann in je 0,05 ml 50%igem Pyridin gelöst und auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll, Best.Nr. 2043b Mgl., 580 x 600 mm) linienförmig auf je 1 cm aufgetragen. Das Chromatogramm wurde mit dem Laufmittel PBEW absteigend entwickelt, getrocknet und mit Ninhydrin-Reagenz besprüht. Nach etwa 30 Minuten Erwärmung im Ofen bei ca. 50°C konnten die Chromatogramme ausgewertet werden. Die Peptide waren dann als bläulich/violette bzw. gelblich/gräuliche Flecken sichtbar.

Bei den Peptidtrennungen über Sephadex G 50 (superfine), Sephadex G 50 (fine) und über Dowex M71 sowie bei der Trennung der Peptide von der Spaltung mit Staphylococcus aureus Protease über SE-Zellulose wurden die Peptide dünnschichtchromatographisch nachgewiesen. Dazu wurde aus jeder 2. Fraktion 1/20 des Fraktionsvolumens auf je 1 cm einer Zellulose-Dünnschichtplatte (DC-Alufolie/Zellulose) aufgetragen und mit dem Laufmittel PBEW aufsteigend chromatographiert. Die getrockneten Platten wurden mit Ninhydrin-Reagenz besprüht und bei 60°C im Ofen für 30 Minuten erwärmt.

Als weitere Nachweismethode fand auch die im Kapitel B.II.4.6. erwähnte Peptidkarten-(Fingerprint-)Technik Anwendung.

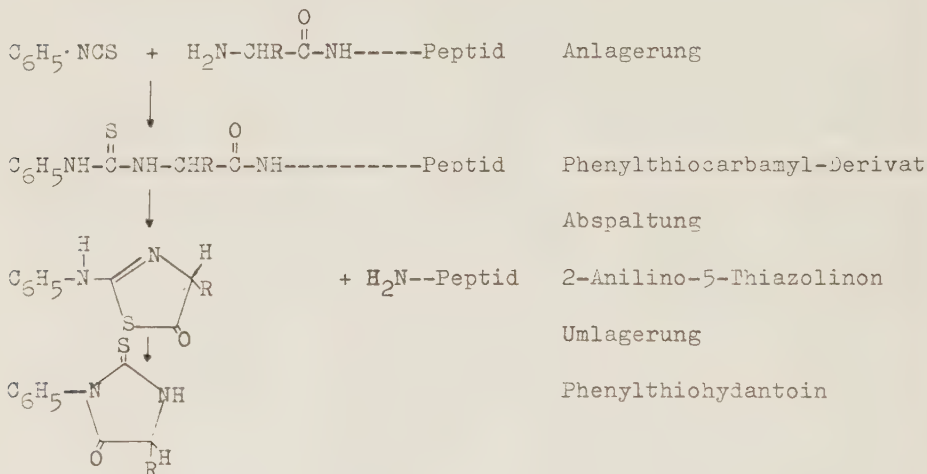
6. Elution der Peptide von Dünnschichtplatten

Bei der Trennung der Peptide auf Dünnschichtplatten wurde nur ein Teststreifen mit Ninhydrin-Reagenz besprüht, der Rest wurde beim Besprühen abgedeckt. Die mit Ninhydrin besprühten Bereiche wurden in der Regel für Hydrolysen benutzt (bei Peptidkarten die gesamten Peptidflecken). Dazu wurden die Dünnschichtplatten nach dem Besprühen mit Ninhydrin-Reagenz mit Aceton gewaschen, um überschüssiges Reagenz zu entfernen. Dann wurden die Peptidflecken einzeln mit einem Spatel abgekratzt, in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf Gerätebau, Hamburg) überführt und je 0,2 ml 5,7 N HCl (mit 0,02 % β -Mercaptoäthanol) dazugegeben. Eluiert wurde für ca. 1 h bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers (Vortex-Genie, Bender & Hobein, Zürich). Das Zellulosematerial wurde mit einer Beckman Microfuge B (Beckman Instruments, München) abzentrifugiert und der Überstand in ein kleines Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und in ein speziell gereinigtes Reagenzglas (80 x 8 mm) pipettiert. Das Reagenzglas wurde am Bunsenbrenner ausgezogen, dann wurde mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, mehrmals mit Stickstoff gespült und schließlich unter Vakuum abgeschmolzen. Nach 20 h Hydrolyse im Ofen bei 110°C wurden die Hydrolysegläser geöffnet und die Proben im Exsikkator über NaOH-Plättchen an der Wasserstrahlpumpe unter Erwärmung durch eine Rotlicht-Lampe (Osram Siccatherm) getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 0,06 ml pH 2,2-Puffer gelöst und jeweils ca. 0,045 ml auf den Durrum-Aminosäurenanalysator aufgetragen und im Absorptionsbereich 0,5 OD gemessen.

Die nicht mit Ninhydrin gefärbten Bereiche der Peptidbanden wurden in der Regel für die Sequenzierung verwendet. Dazu wurden die Bereiche ausgekratzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Dann wurden je nach Menge des ausgekratzen Materials 0,2 bis 1,5 ml 50%ige Essigsäure hinzugegeben und für ca. 1 h bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln mit dem Vortex eluiert. Nachdem die Zellulose abzentrifugiert worden war, wurde der Überstand in einen Spitzkolben gegeben und das Sediment noch zweimal mit je 0,2 bis 1,5 ml 5%iger Essigsäure gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und dann am Rotationsverdampfer eingedampft. Das so eluierte und getrocknete Peptid konnte dann für die Sequenzierung verwendet werden.

7. Sequenzierung der Peptide

Die wichtigste Methode zur Sequenzierung von Proteinen und Peptiden ist der stufenweise Abbau nach Edman (1949) mit Phenylisothiocyanat. Die Reaktion verläuft nach dem folgenden Schema:



Man unterscheidet beim Edman-Abbau drei verschiedene Reaktionsschritte: die Anlagerung, die Abspaltung und die Umlagerung. Bei der Anlagerung lagert sich in schwach basischem Milieu das Phenylisothiocyanat an die freie Aminogruppe des Peptids an unter Bildung eines Phenylthiocarbamyl-Derivats. Die Abspaltung der derivatisierten N-terminalen Aminosäure geschieht unter stark sauren Bedingungen. Dabei entsteht ein 2-Anilino-5-Thiazolinon in der Ammoniumform, das von dem Restpeptid durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln abgetrennt werden kann.

Obwohl das 2-Anilino-5-Thiazolinon als ein spezifisches Derivat der N-terminalen Aminosäure zu deren Identifizierung dienen könnte, wird es wegen seiner relativen Instabilität umgelagert zum 3-Phenyl-2-Thiohyalantoin (PTH). Diese Umlagerung geschieht in einem wäßrigen sauren Milieu und die PTH-Derivate der Aminosäuren werden dann auf Dünnschicht-Platten (DC-Alufolien Kieselgel 60 F 254, 20 x 20 cm; Merck, Darmstadt) identifiziert. Das Restpeptid wird weiteren Abbau-Zyklen unterworfen und kann so vollständig sequenziert werden.

Da die Reaktionen mit hohen Ausbeuten ablaufen, bot es sich an, den Edman-Abbau zu automatisieren. So gibt es gegenwärtig zwei verschiedene automatisierte Verfahren, den Protein-Sequenator nach Edman und Begg (1967), der sich besonders für die Sequenzierung von großen Peptiden und Proteinen eignet, und den Festphasen-Peptidsequenator nach Laursen (1971), der für die Sequenzierung von Peptiden verwendet wird. Dabei werden die Peptide an ein Kunststoffharz gekuppelt und dann dem Edman-Abbau unterworfen.

Mit dem Proteinsequenator wurde die Aminosäuresequenz des N-terminalen Bereichs von S13 (Wittmann-Liebold, 1973a) sowie ein Bromcyan-Peptid untersucht.

Eine Reihe von tryptischen Peptiden und Peptiden von der Spaltung mit *Staphylococcus aureus* Protease wurden mit dem Festphasen-Peptidsequenator sequenziert.

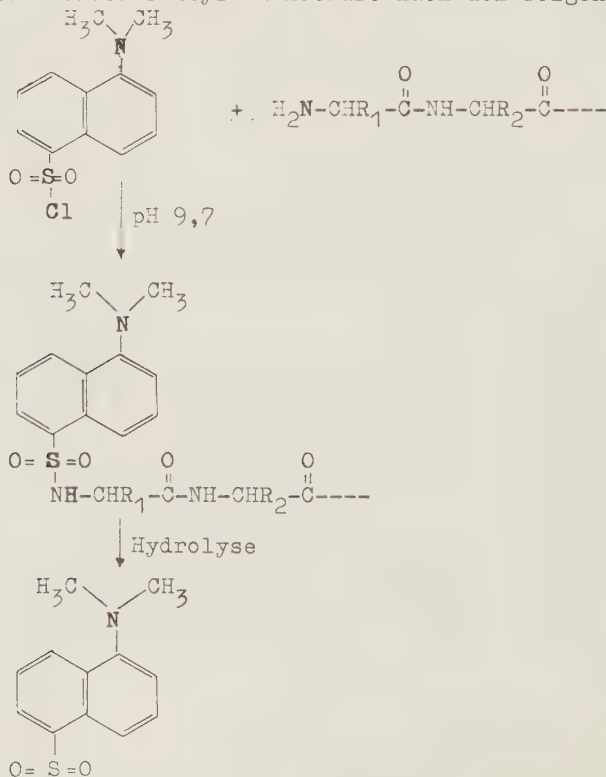
Vor der automatischen Sequenzierung wurden die Peptide auf ihre Reinheit mit Hilfe der Dansylierungs-Methode untersucht.

Eine weitere Sequenzierungsmethode, die für die meisten Peptide angewandt wurde, ist die Dansyl-Edman-Methode (Hartley, 1970).

Schließlich wurde das Protein S13 auch enzymatisch vom C-Terminus her mit den Carboxypeptidasen A, B und C abgebaut. Auf diese Weise ließen sich Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich ziehen.

7.1. Bestimmung der N-terminalen Aminosäure durch Dansylierung

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure von Peptiden ist wichtig für deren Charakterisierung und als Test für die Reinheit des Materials. Als Reagens dient Dansylchlorid (1-Dimethylamino-naphthalin-5-Sulfonylchlorid) (Fluka; Buchs, Schweiz), eine fluoreszierende Substanz. Dansylchlorid reagiert mit der N-terminalen freien Aminogruppe eines Peptids oder Proteins unter Bildung einer fluoreszierenden Dansyl-Aminosäure nach dem folgenden Schema:



Ca. 2 nM gelösten Peptids bzw. Proteins wurden in ein kleines Reagenzglas (5 x 0,4 cm) überführt und im Exsikkator über NaOH-Plättchen an der Ölpumpe getrocknet. Dann wurden 0,01 ml 0,2 M Natriumbicarbonat hinzugegeben, und es wurde wiederum getrocknet. Schließlich wurde eine Dansylchlorid-Lösung aus 2,5 mg Dansylchlorid /ml in Aceton mit H₂O bidest im Verhältnis 1:1 verdünnt und darauf 0,01 ml der verdünnten Lösung zum Peptid zugegeben. Es wurde in einem mit Parafilm verschlossenen Glas für 30 Minuten bei 45°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde wieder über NaOH im Exsikkator getrocknet, 0,01 ml 5,7 N HCl (mit 0,02 % B-Mercaptoethanol) dazugegeben und das Glas unter Vakuum abgeschmolzen. Es wurde für 15 h bei 105°C hydrolysiert, und danach wurde das Hydrolyseglas geöffnet und die Probe im Exsikkator über NaOH an der Ölpumpe getrocknet. Die trockene Probe wurde in 0,005 ml 95%igem Äthanol gelöst und die gesamte Menge auf die eine Seite einer 5 x 5 cm großen doppelseitig mit Polyamid beschichteten Dünnschichtplatte (DC-Fertigfolien F 1700 Micropolyamid, Schleicher & Schüll, Dassel) in der linken unteren Ecke punktförmig aufgetragen. Dann wurde auf der Rückseite der Polyamidplatte ein Tropfen mit Referenz-Dansylaminosäuren genau gegenüber dem Probenauftrag mit Hilfe einer Schablone aufgetragen. Es wurde zweidimensional mit den folgenden Laufsystemen chromatographiert:

1. Dimension : 1,5 %ige Ameisensäure

2. Dimension : a) Toluol:Essigsäure = 10:1

b) Essigsäureäthylester:Methanol:Essigsäure=20:1:1

c) 1 M NH₃ · H₂O : Äthanol = 1:1

Nach dem Lauf in der 1. Dimension wurde das Dünnschichtchromatogramm getrocknet, um 90° gedreht und dann in das Laufmittel (a) für die 2. Dimension gestellt. Nach erneutem Trocknen wurde die Platte im UV bei 254 nm betrachtet. Mit diesen beiden Chromatographie-Schritten erreicht man im Wesentlichen eine gute Trennung von Isoleucin, Leucin, Valin, Phenylalanin, Methionin, Tyrosin und Prolin (siehe Abbildung 1).

Um die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin, Serin, Glycin, Alanin, Lysin, Histidin und Arginin gut sehen zu können, muß man die Platte zusätzlich im Laufmittel (b) in der gleichen Laufrichtung wie mit dem Laufmittel (a) chromatographieren (siehe Abbildung 2). Das Laufmittel (c) ermöglicht die Erkennung von Cysteinsäure.

Abbildung 1: Trennung der Dansyl-Aminosäuren (System 1+2a)

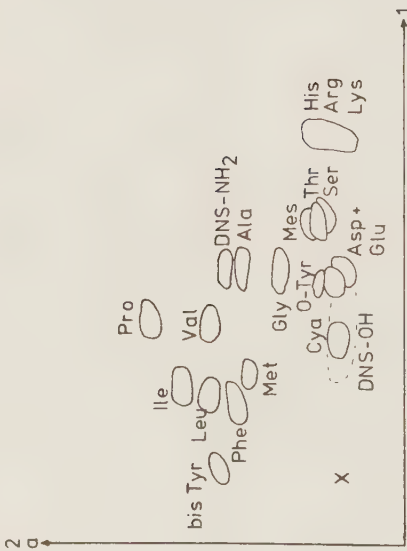
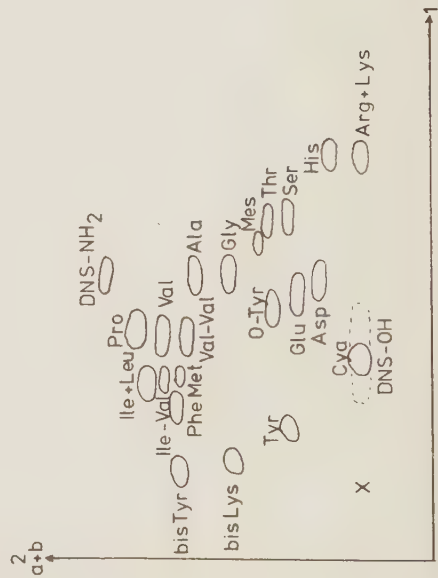


Abbildung 2: Trennung der Dansyl-Aminosäuren (System 1+2ab)



7.2. Dansyl-Edman-Abbau

Die soeben beschriebene Dansylierungsmethode zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure eines Peptids läßt sich kombinieren mit dem bereits erwähnten Edman-Abbau mit Phenylisothiocyanat.

Die Dansyl-Edman-Methode besteht darin, daß man einen Edman-Abbau per Hand durchführt und daß nach jedem Abbau-Schritt ein Aliquot (ca. 1-2 nM) des Restpeptids für die Dansylierung abgenommen wird. Das zu sequenzierende Peptid wurde in maximal 0,1 ml H₂O bidest gelöst, in ein sauberes Reagenzglas (ca. 5 x 1 cm) mit Schliff und Schliffzapfen überführt und im Exsikkator über NaOH an der Ölpumpe getrocknet. Dann wurden 0,05 ml H₂O bidest zugegeben, geschüttelt, ein Aliquot für die Dansylierung abgenommen und zum Rest 0,05 ml 5%iges Phenylisothiocyanat in Pyridin zugegeben. Das Gemisch wurde geschüttelt, mit Stickstoff gespült und mit Schliffzapfen verschlossen im Dunkeln bei 45°C für 1 h inkubiert. Danach wurde in einem vorgewärmten Exsikkator über NaOH und Phosphorpentoxyd an der Ölpumpe getrocknet, dann das Peptid in 0,1 ml Trifluoressigsäure gelöst und für 30 Minuten bei 45°C inkubiert. Dann wurde das Peptid in einem Exsikkator über NaOH getrocknet, und zur trockenen Probe wurde 0,05 ml H₂O bidest zugegeben. Nach intensivem Schütteln wurden 0,2 ml n-Butylessigester hinzugefügt, geschüttelt und mit der Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert. Die Butylessigester-Phase wurde vorsichtig abgehoben und die Extraktion noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Butylessigester-Phasen enthielten neben den Salzen das 2-Anilino-5-Thiazolinon-Derivat der N-terminalen Aminosäure, und sie wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

Das Restpeptid blieb in der wäßrigen Phase und wurde nach dem 3. Extraktionsschritt wieder eingetrocknet und in 0,05 ml H₂O bidest gelöst. Damit war ein Schritt des Edman-Abbaus abgeschlossen, und es wurde wieder mit der Entnahme eines Aliquots für die Dansylierung begonnen.

In den Fällen, in denen als Dansyl-Aminosäure Asparaginsäure oder Glutaminsäure festgestellt worden waren, wurde die Umlagerung der in der Butylelessigester-Phase vorliegenden 2-Anilino-5-Thiazolinone zu den Thiohydantoinen durchgeführt, um auf diese Weise eindeutig nachweisen zu können, daß es sich ursprünglich um die Aminosäure Asparaginsäure/Glutaminsäure oder um deren Amid gehandelt hat. Dazu wurde die entsprechende n-Butylelessigester-Phase am Rotationsverdampfer eingedampft, dann 0,5 ml 20%ige Trifluoressigsäure dazugegeben und für 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Dann wurde die Probe auf eine kleine Säule (1 x 0,5 cm), die mit Ionenaustauscherharz Dowex 50 W x 4 (Serva, Heidelberg) gefüllt war, gegeben und das Eluat in einem sauberen Spitzkolben aufgefangen. Nach Spülen der Säule mit Methanol wurde das Eluat am Rotationsverdampfer einrotiert, die trockene Probe in 0,02 ml Dichloräthan:Methanol = 7:3 gelöst und auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte mit Fluoreszenzindikator (DC-Alufolie Kieselgel 60 F 254; Merck, Darmstadt) auf 1 cm aufgetragen. Es wurde in folgenden Laufsystemen eindimensional chromatographiert:

- a) Chloroform : Propanol primär : Propanol sek. = 98 : 1 : 1
- b) Chloroform : Methanol = 90 : 10 .

Nach der Chromatographie im System (a) und (b) konnten die P_{ED}-Aminosäuren im UV-Licht bei 254 nm identifiziert werden.

In vielen Fällen war die Identifizierung der PTH-Aminosäuren auf der Dünnschichtplatte durch Salzflecken beeinträchtigt. Um die Identifizierung zu bestätigen, wurde dann der entsprechende Fleck von der Dünnschichtplatte ausgekratzt und mit 0,1 ml Dichloräthan/Methanol (7:3) eluiert (Elutionsdauer ca. 2 h). Nach Abzentrifugation des Kieselgel-Materials wurde der Überstand in ein speziell gereinigtes Hydrolyseglas pipettiert, im Exsikkator an der Ölpumpe getrocknet, 0,2 ml 5,7 N HCl (mit 0,02 % β -Mercaptoäthanol) dazugegeben, im Vakuum abgeschmolzen und für 20 h bei 110°C hydrolysiert. Die getrocknete Probe wurde in pH 2,2-Puffer gelöst und auf einen LKB-Aminosäurenanalysator gegeben.

Bei besonderen Schwierigkeiten bei der Dansylierungsreaktion (z.B. Unterscheidung zwischen Lysin, Histidin und Arginin) wurde das 2-Anilino-5-Thiazolinon-Derivat zur freien Aminosäure zurückgespalten. Dazu wurde die entsprechende Butylessigester-Phase in ein speziell gereinigtes Reagenzglas pipettiert und am Rotationsverdampfer eingedampft. Danach wurden 0,2 ml 5,7 N HCl (mit 0,02 % β -Mercaptoäthanol) dazugegeben, evakuiert, abgeschmolzen und für 20 h bei 110°C hydrolysiert. Die freigesetzte Aminosäure wurde dann auf einen LKB Aminosäurenanalysator aufgetragen und identifiziert.

Der Nachweis von Cystein war durch Dansylierung wegen der Instabilität dieser Aminosäure nicht möglich. Daher wurde das Peptid zuvor mit Perameisensäure nach der Methode von Hirs oxidiert. Die entstandene Cysteinsäure wurde auf dem üblichen Wege dansyliert und mit dem Laufmittel (c) für die 2. Dimension auf der Polyamid-Platte chromatographiert.

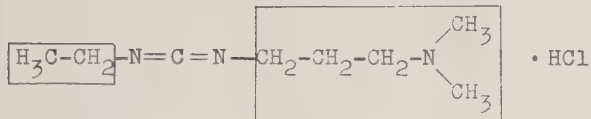
In einem Fall lag ein Peptid mit C-terminalem Cystein vor. Es wurde mit der Dansyl-Edman-Methode bis zur letzten Stufe abgebaut (bei Tripeptid also 2 Abbauzyklen) und die freie C-terminale Aminosäure mit Perameisensäure wie beschrieben oxidiert. Dann wurde die Probe im Exsikkator an der Ölpumpe getrocknet, in pH 2,2-Puffer gelöst und direkt (ohne vorherige Hydrolyse) auf einen LKB-Aminosäureanalysator gegeben.

7.3. Festphasen-Peptidsequenator

Zur Sequenzierung im Festphasen-Peptidsequenator nach Laursen (1971) wurden die Peptide kovalent an ein Aminopolystyrolharz gebunden und mit Hilfe eines automatisierten Edman-Abbaus sequenziert. Die PTH-Aminosäuren wurden dünnschichtchromatographisch auf DC-Alufolie Kieselgel 60 F 254 (Merck, Darmstadt) identifiziert. Zur Bindung der Peptide an das Kunststoffharz wurde ausschließlich die sogenannte EDC-Methode verwendet (Wittmann-Liebold und Lehmann, 1975):

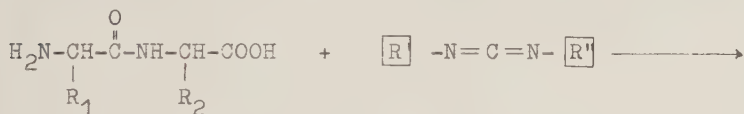
Etwa 30 mg Aminopolystyrolharz wurden in 1 ml Puffer (1 M Pyridin/HCl, pH 5,0) ca. 10 Minuten gerührt, bis das Harz eine violette Farbe annahm. Dann wurde zweimal mit je 8,0 ml H₂O bidest und anschließend zweimal mit je 1 ml Dimethylformamid gewaschen. Das Peptid (50-100 nM) wurde in 0,05 ml Puffer (1 M Pyridin/HCl, pH 5,0) gelöst und zum Harz gegeben. Das Gefäß, in dem das Peptid vorbereitet worden war, wurde mit 0,2 ml Dimethylformamid gespült und die Flüssigkeit ebenfalls zum Harz gegeben. Schließlich wurden noch 2 mg EDC (1-Äthyl-3-(3 Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid · HCl) (in 0,02 ml H₂O bidest und 0,08 ml Dimethylformamid gelöst) zur Harzsuspension gegeben und für 1 h bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die dabei ablaufenden Reaktionen sind im Schema wiedergegeben.

EDC - Methode (Reaktionsschema):



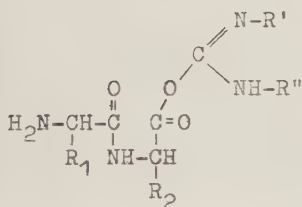
R' "EDC" R''

1-Äthyl-3-(3 Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid · HCl

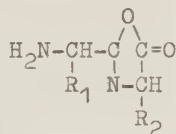


Peptid

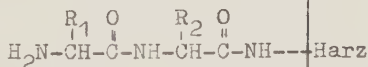
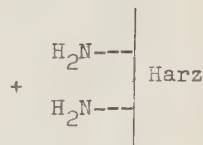
EDC



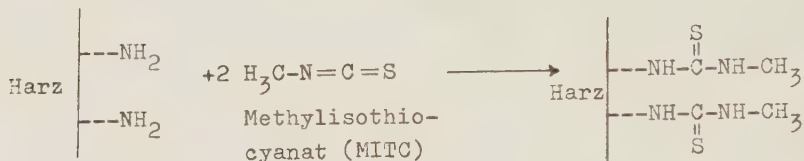
O-acetylierter Harnstoff



Oxazolinon



Danach wurde das Harz abzentrifugiert und mit 0,2 ml 1 M N-Methylmorpholin-Puffer, pH 8,9 , gewaschen. Dann wurden die freien α -Aminogruppen mit Methylisothiocyanat nach folgendem Schema blockiert:



Dazu wurde zum Harz ein Gemisch aus 0,2 ml Acetonitril/Methylisothiocyanat = 1:1 und aus 0,2 ml N-Methylmorpholin-Puffer, pH 8,9 , zugegeben und für 30 Minuten bei 30°C unter Rühren inkubiert. Danach wurde das Harz wieder abzentrifugiert, mit Dimethylformamid, mit Methanol und mit Äther gewaschen und dann getrocknet. Dann wurde das Harz in die Säule im Festphasen-Peptidsequenator eingefüllt und der Edman-Abbau durchgeführt.

7.4. Proteinsequenator

Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz des Proteins geschah mit einem Proteinsequenator der Firma Beckman (Palo Alto, USA), der von Wittmann-Liebold (1973b) verbessert war. Der Edman-Abbau findet bei diesem Gerät in einem rotierenden Zylinder statt. Zunächst bildet das Protein an der Zylinderinnenseite einen dünnen Film. Die Reagenzien werden von unten her in den Zylinder eingeleitet und am oberen Zylinderrand wieder abgeleitet.

Der Edman-Abbau geschieht in dem Gerät folgendermaßen:

Das Phenylisothiocyanat wird in einem 0,5 M Quadrol-Puffer

(N,N,N',N' -Tetrakis-(2-Hydroxypropyl)-Äthylendiamin), der mit

Trifluoressigsäure auf pH 9,0 gebracht wurde, gelöst, und die

Anlagerung geschieht durch Inkubation bei 53°C für 30 Minuten.

Überschüssiges Phenylisothiocyanat und Quadrol wird mit Benzol und

Essigester extrahiert. Das Phenylthiocarbamyl-Derivat wird mit

Heptafluorbuttersäure abgespalten und dann mit Chlorbutan extrahiert

(alles bei 53°C). Die Umlagerung des 2-Anilino-5-Thiazolinons in

das entsprechende Phenylthiohydantoin-Derivat geschieht mit 20%iger

Trifluoressigsäure bei 52°C während 15 Minuten. Danach beginnt der

nächste Abbauschritt.

C. Ergebnisse

1. Isolierung von S13

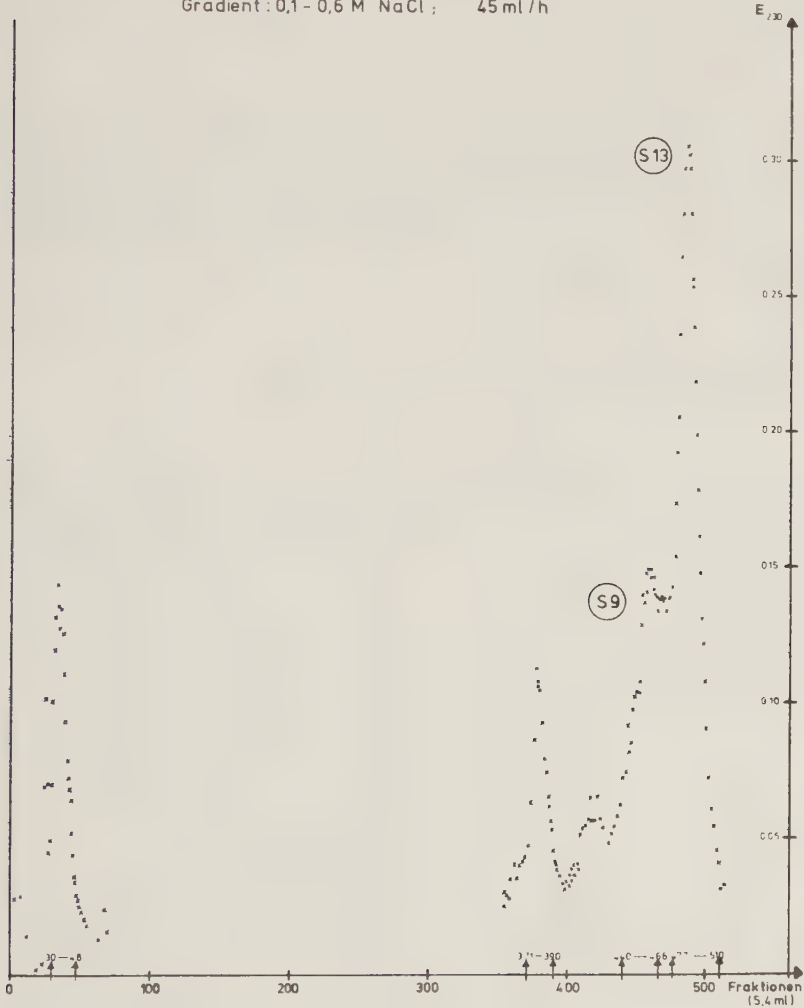
Das Protein S13 lag in der Regel relativ sauber mit Spuren der Proteine S9, S14 und S18 vor. Nur in den Fällen, in denen die Verunreinigung über ca. 5% ausmachte, wurde das Proteingemisch nachgereinigt. Dies geschah in einem Fall durch Gelfiltration auf einer Sephadex G 100 Säule, meist jedoch mit Hilfe von Ionenaustauscher-Gelchromatographie auf Phosphorzellulose. Auf diese Weise wurde das Protein S13 von den Verunreinigungen durch die Proteine S9, S14 und S18 getrennt, und es konnte dann für die Bestimmung der Primärstruktur verwendet werden. Das Elutionsprofil eines Phosphorzellulose-Säulenlaufs ist in der Abbildung 4 wiedergegeben, und die Abbildung 3 zeigt die Identifizierung von S13 in den Fraktionen 477-510 mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Abbildung 3: Identifizierung von S13

(mit 70S ribosomalen Proteinen von E.coli als Referenz

Abbildung 4: Elutionsprofil eines Phosphorzellulose-Säulenlaufs

Phosphorzellulose Mannex-P (Standard Capacity 0,88 meq/g) 60 x 2 cm
 6 M Harnstoff; 0,05 M NaH_2PO_4 ; 0,012 M Methylamin; pH 6,5; 2 x 2,5 l
 Gradient: 0,1 - 0,6 M NaCl; 45 ml/h



2. Aminosäurenzusammensetzung von S13

Zur Bestimmung der Aminosäurenzusammensetzung des Proteins S13 wurden vier unabhängige Totalhydrolysen angefertigt. Dazu wurde Material verwendet, das nach der zweidimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese und der Disc-Elektrophorese nur sehr geringe Spuren an Verunreinigungen enthielt.

Zusätzlich wurden Totalhydrolysen mit längeren Hydrolysezeiten (48 h , 65 h) und nach Oxidation mit Perameisensäure (zur quantitativen Bestimmung von Cystein als Cysteinsäure) durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind in der Tabelle 2 zusammen mit den theoretischen Werten aufgeführt.

Tabelle 2: Aminosäurenzusammensetzung von S13

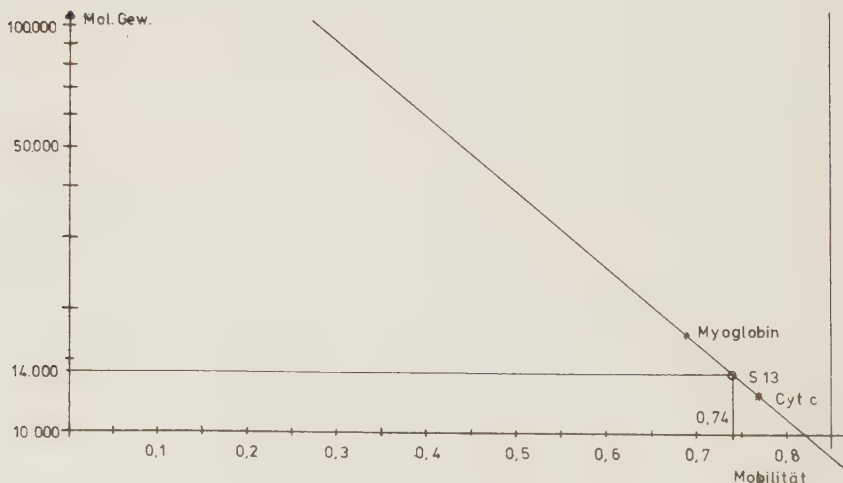
	a	b	c	
Cys	1	1,21 ⁺		a) Zahl der Reste nach
Asx	8	8,00	7,60	Sequenz
Thr	6	6,00	5,50	b) Totalhydrolyse, 20 h
Ser	6	5,70	4,80	c) Totalhydrolyse, 65 h
Glx	8	8,70	8,70	
Pro	4	4,10	4,10	+) Bestimmung als
Gly	11	10,90	10,70	Cysteinsäure nach
Ala	11	10,90	10,60	Oxidation
Val	7	6,20	6,70	Alle Werte sind
Met	2	1,80	1,78	unkorrigiert.
Ile	12	10,50	10,70	
Leu	9	9,40	9,20	
Tyr	2	1,50	1,07	
Phe	1	0,90	1,01	
His	3	2,90	2,79	
Lys	11	10,70	10,58	
Arg	15	15,30	14,70	

Es zeigt sich, daß der Wert für Glx in der Totalhydrolyse um etwa 10% zu hoch liegt, was wahrscheinlich durch Verunreinigung mit Protein S9 bedingt ist. Der Wert für Ile und Val ist um ca. 10% zu niedrig; dies ist durch unvollständige Hydrolyse der entsprechenden Peptidbindungen (z.B. Ile - Leu und Val - Val) verursacht. Bei verlängerter Hydrolysezeit nehmen die meisten Werte aufgrund von Zerstörungen der Aminosäuren ab; die Werte für Ile und für Val nehmen jedoch deutlich zu, weil die Hydrolyse der entsprechenden Peptidbindungen vollständiger wird. Tryptophan konnte mit keiner der angewendeten Nachweismethoden festgestellt werden: Die Behandlung einer tryptischen Peptidkarte mit Ehrlich-Reagenz verlief negativ. Bei der Hydrolyse des Proteins S13 mit Methansulfonsäure wurde kein Tryptophan gefunden, und die Behandlung von S13 mit BNPS-Skatol führte zu keiner Spaltung. Die Messung der Absorptionen von S13 und nachfolgende Berechnungen nach der Methode von Goodwin und Morton (1946) führten zu einem Wert für die Zahl der Tryptophan-Reste im Protein von ca. 0,5 .

3. Molekulargewicht von S13

Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Primärstruktur des Proteins S13 ergibt sich ein Molekulargewicht von 12.970 Dalton. Damit liegen die von Dzionara et al.(1970) veröffentlichten Werte um etwa 8% zu hoch; dies liegt allerdings für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese noch innerhalb der gegebenen Fehlergrenze von $\pm 10\%$. Bei der Molekulargewichtsbestimmung, die in dieser Arbeit mit der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Technik durchgeführt wurde, ergab sich ebenfalls ein Wert von 14.000 Dalton (Abbildung 5).

Abbildung 5: Molekulargewichtsbestimmung von Protein S13



4. Spaltung mit BNPS-Skatol

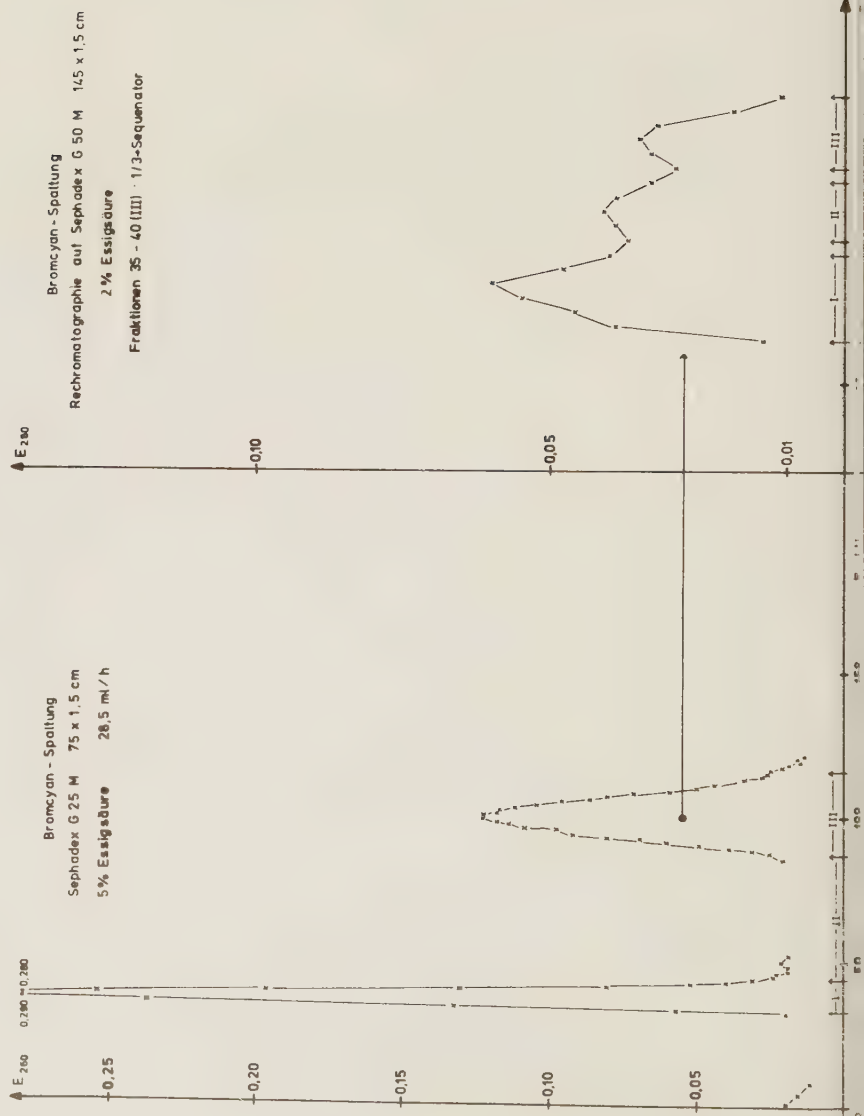
Bei der Spaltung von S13 mit BNPS-Skatol traten keine Spaltprodukte auf. Das wurde als weiterer Hinweis darauf gewertet, daß im Protein S13 kein Tryptophan enthalten ist (vgl. Kapitel C.2.).

5. Spaltung mit Bromcyan

Das Protein S13 enthält insgesamt zwei Methioninreste. Daher waren bei der Spaltung mit Bromcyan drei verschiedene Peptide als Spaltprodukte zu erwarten. Allerdings konnte nach der Spaltung von S13 mit Bromcyan nur ein Peptid durch mehrmalige Säulenchromatographie in genügender Menge und Reinheit gewonnen werden, um daran Untersuchungen über die Aminosäuresequenz vornehmen zu können (Abbildung 6). Allgemein war die Ausbeute bei dieser Spaltung sehr schlecht, und angesichts der relativ schwierigen Reinigung der Spaltprodukte wurde auf eine Wiederholung der Spaltung verzichtet. Offensichtlich sind die vorliegenden Methionin-Peptidbindungen nur schwer spaltbar (Met - Ser, Met - Asp). Die Aminosäuresequenz des einzigen isolierten Bromcyan-Peptids wurde mit dem Proteinsequenator untersucht, und sie konnte für den N-terminalen Bereich bestimmt werden. Allerdings war das Peptid (Position 81-94) mit dem N-Perminus des Proteins S13 (Position 1-14) und mit einem anderen Bromcyan-Peptid (Position 75-88) verunreinigt, wie die folgende Gegenüberstellung zeigt:

Asp	Leu	Lys	Ala	Tyr	?	Asn	Leu	Pro	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Gefundene Sequenz des BrCN-Peptids
Ala	Arg	Gly	Lys			Gly		Arg	Ile			Ile		
Lys			Gln			Asp								
			Glu											
Asp	Leu	Gly	Cys	Tyr	Arg	Gly	Leu	Arg	His	Arg	Arg	Gly	Leu	Pos. 81-94
Ala	Arg	Ile	Ala	Gly	Ile	Asn	Ile	Pro	Asp	His	Lys	His	Ala	Pos. 1-14
Ser	Ile	Lys	Arg	Leu	Met	Asp	Leu	Gly	Cys	Tyr	Arg	Gly	Leu	Pos. 75-88

Abbildung 6: Trennung der Peptide von der Spaltung von S13 mit Bromcyan



6. Spaltung mit TPCK-Trypsin

6.1. Peptidkarte der tryptischen Peptide

Die Peptidkarte der tryptischen Peptide zeigt Abbildung 7. Der Auftragspunkt ist rechts unten (nahe der Anode bei der elektro-phoretischen Trennung). Die Identifizierung der einzelnen Peptidflecken, die durch Aminosäureanalysen erfolgte, ist in der schematischen Zeichnung (Abbildung 8) wiedergegeben.

Die Ausbeute an Peptid T4 war etwa doppelt so hoch wie die der anderen Peptide. Das ließ darauf schließen, daß das Peptid T4 an zwei Stellen in der Sequenz von 313 enthalten ist. Diese Vermutung wurde bei der vollständigen Ermittlung der Aminosäuresequenz des Proteins bestätigt. Die Nummerierung der Peptide erfolgte entsprechend ihrem Auftreten in der Sequenz. Das Peptid T3 konnte niemals auf einer tryptischen Peptidkarte lokalisiert werden, wahrscheinlich bedingt durch eine schlechte Farbreaktion des N-terminalen Histidins mit dem Ninhydrin-Reagenz.

Abbildung 7: Peptidkarte der tryptischen Peptide

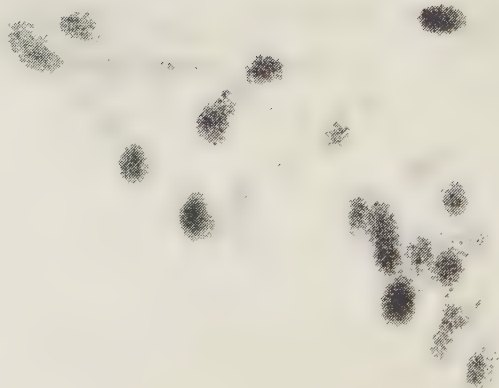


Abbildung 8: Zuordnung der tryptischen Peptide



6.2. Trennung der tryptischen Peptide

Die Trennung der tryptischen Peptide wurde auf folgende Weisen vorgenommen:

a) Bei der Säulenchromatographie mit Sulfoäthylzellulose waren die Peptide T2, T3, T7, T10, T19 und T21 nicht verunreinigt und konnten direkt sequenziert werden. Die restlichen Peptide mußten auf Papier oder auf Zellulose-Dünnschichtplatten nachgereinigt werden.

b) Bei zwei weiteren tryptischen Spaltungen wurde die Trennung der Peptide in mehreren Schritten durchgeführt: Nach der enzymatischen Spaltung wurde das Material zuerst über eine Säule, die mit Sephadex G 50 (fine) bzw. Sephadex G 50 (superfine) gefüllt war, vorgereinigt. So konnten die Peptide T2, T6, T7, T11 und T21+19 von den restlichen Peptiden abgetrennt, auf Zellulose-Dünnschichtplatten nachgetrennt und dann direkt sequenziert werden. .

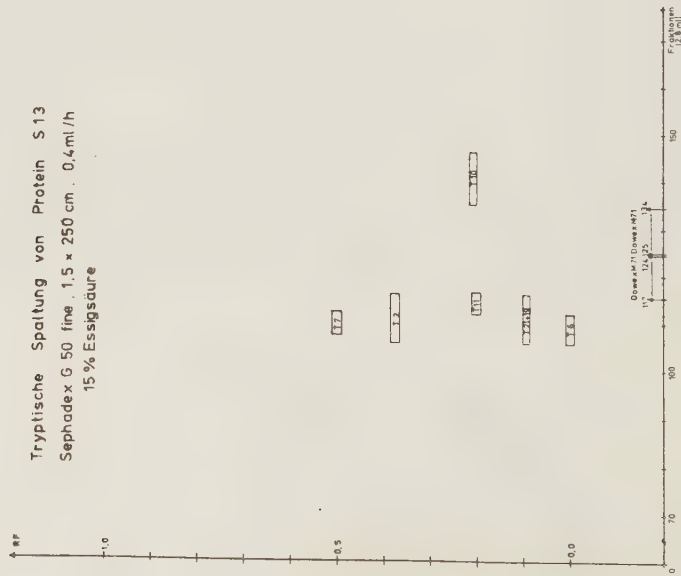
Die restlichen Fraktionen des Säulenlaufs (das Elutionsprofil zeigt die Abbildung 9) wurden zu zwei Portionen vereinigt und jeweils über eine Dowex M71-Säule nachgetrennt (Abbildungen 10 und 11).

Weitere Nachtrennungen der Peptide wurden mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtelektrophorese (bei den methioninhaltigen Peptiden T11 und T12) durchgeführt.

Die Bruttozusammensetzungen der tryptischen Peptide sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Abbildung 9:

Trennung der tryptischen Peptide (G 50 fine)

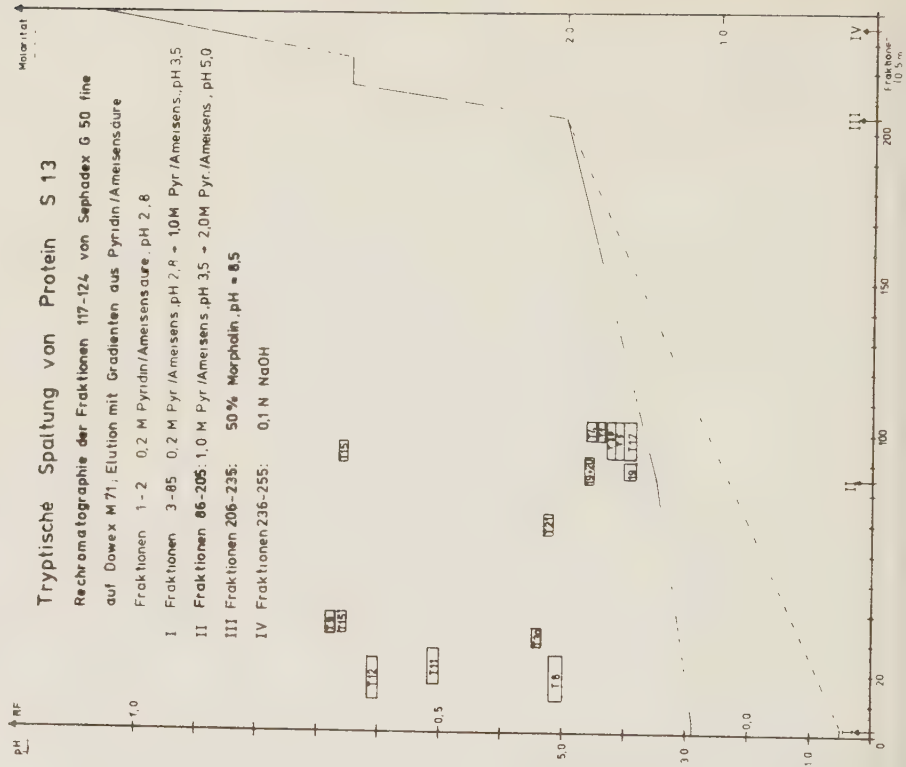


Tryptische Spaltung von Protein S 13

Rechromatographie der Fraktionen 117-124 von Sephadex G 50 fine auf Dowex M 71, Elution mit Gradienten aus Pyridin/Ameisensäure

Fraktionen 1-2 0,2 M Pyridin/Ameisensäure, pH 2,8

- | | | | |
|-----|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| I | Fraktionen 3-85 | 0.2 M Pyr./Ameisens. pH 2.8 | → 1.0 M Pyr./Ameisens. pH 3.5 |
| II | Fraktionen 86-205 | 1.0 M Pyr./Ameisens. pH 3.5 | → 2.0 M Pyr./Ameisens. pH 5.0 |
| III | Fraktionen 206-235 | 50 % Morpholin | pH = 8.5 |
| IV | Fraktionen 236-255 | 0.1 N NaOH | |



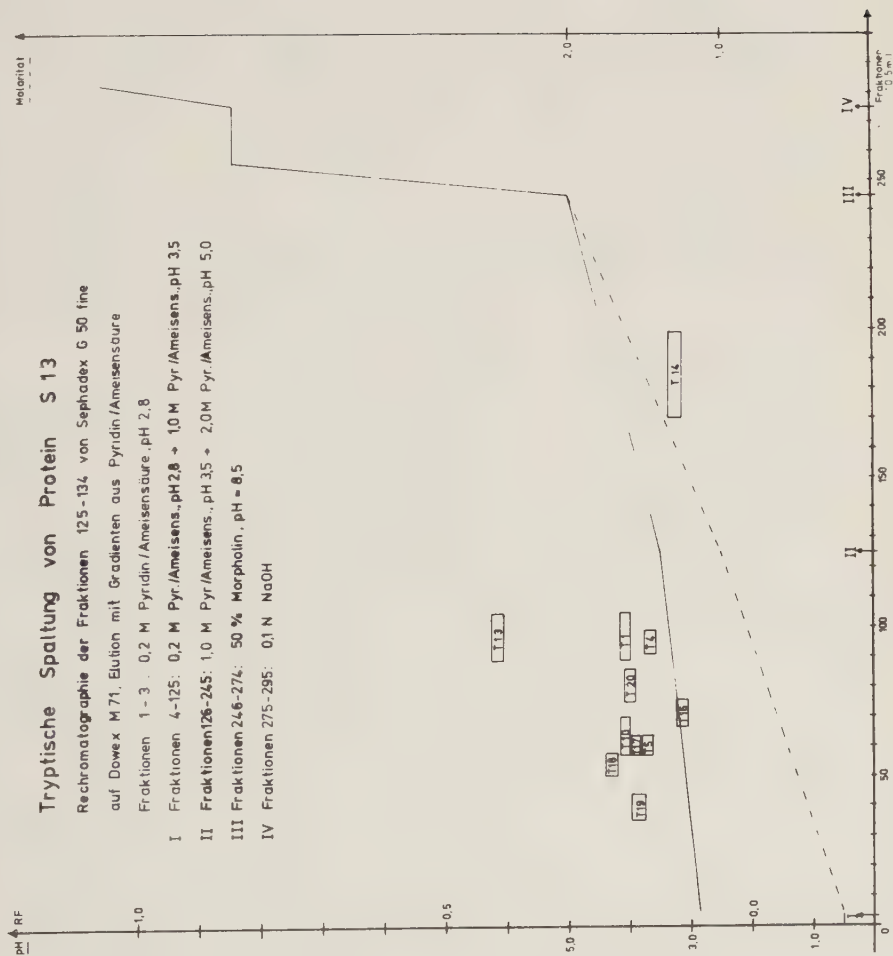


Tabelle 3: Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide

Position	1-2	3-12	13-26	23-26	27-28 107-108	29-30	31-43	44-56	57-61	62-69	70/78/92	7
Name	T1	T2	T3	T3a	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
Cys												
Asx		1.87					1.00	1.07	0.93 ^a	1.08		
Thr			1.00		0.79 ^a			1.00				
Ser			1.32			0.54 ^a		1.43				
Glx							1.25	3.88	1.14	1.26		0
Pro		0.95										
Gly		1.00	2.13	2.04			1.26	1.03		1.19		
Ala	0.65 ^a	1.02	1.99				4.68 ^a		0.97			
Val			1.71	1.00			1.00		0.96	1.49 ^b		
Met												0
Ile		2.78 ^a	2.00				1.97	1.90				2
Leu			1.23				1.08	2.01		1.00		
Tyr			0.59									
Phe										0.72 ^a		
His		1.00	1.09									
Lys		0.95	1.47	0.84		1.00	1.00		1.00			0.9
Arg	1.00				1.00			0.92		0.94	1	

Position	79-86	87-89	90-91	93-97	98-100	101-102	103-106	109/117	109-112	110-112	113-117	113-1
Name	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T19+20	T20	T21+19	T21
Cys	1 ^c											
Asx	1.00						1.04					
Thr						1.09	0.94					
Ser												
Glx					1.00							
Pro				0.85					1.00	0.97	1.12	1.20
Gly	1.19	0.78 ^a		0.93	0.54 ^a				1.03	0.94		
Ala							0.90					
Val				1.00								
Met	0.71											
Ile											1.00	0.81
Leu	1.78 ^a	1.00		1.15								
Tyr	0.76											
Phe												
His			0.80 ^a									
Lys						1.00		1	0.93 ^a		3.09	1.75 ^a
Arg	0.83	0.96	1.00	1.00	0.98		1.00		0.96	1.00		

Unkorrigierte Werte nach 20-stündiger Hydrolyse

a) N-terminale Aminosäure, gefärbt mit Ninhydrin-Reagenz auf der Dünnschichtplatte

b) niedriger Wert aufgrund von unvollständiger Hydrolyse

c) bestimmt als Cysteinsäure nach Oxidation mit Perameisensäure

Die Spaltung mit Trypsin ist normalerweise sehr spezifisch: es wird nur an der Carboxylgruppe von Lysin und Arginin gespalten; bei nachfolgendem Prolin findet die Spaltung nicht statt. Das erklärt das Auftreten von T21 und von T21+19 mit N-terminalem Lysin. Das tryptische Peptid T3a, das bei jeder tryptischen Spaltung mit einer Ausbeute von ca. 50% erhalten wurde, ist auf eine chymotryptische Nebenaktivität zurückzuführen, wobei die Peptidbindung zwischen dem Tyrosin in Position 22 und dem nachfolgenden Glycin hydrolysiert wird. Die Dipeptide T1 und T4 konnten nicht vollständig voneinander getrennt werden, so daß stets leichte gegenseitige Verunreinigungen vorhanden waren. In geringer Ausbeute wurde auch das ditryptische Peptid T7+8 erhalten.

6.3. Sequenzierung der tryptischen Peptide

T1 Ala-Arg

Die Sequenz ergibt sich aus der Spezifität des Trypsins (Arginin als C-terminale Aminosäure). Sie wurde durch die Dansyl-Edman-Methode und die mit dem Proteinsequenator erhaltenen Ergebnisse bestätigt.

T2 Ile-Ala-Gly-Ile-Asn-Ile-Pro-Asp-His-Lys

Die Primärstruktur dieses Peptids wurde durch den Festphasen-Peptidsequenator und durch den Dansyl-Edman-Abbau bestimmt und durch den Proteinsequenator bestätigt.

T3 His-Ala-Val-Ile-Ala-Leu-Thr-Ser-Ile-Tyr-Gly-Val-Gly-Lys

Die Sequenz des größten tryptischen Peptids, T3, wurde durch Analyse mit dem Festphasen-Peptidsequenator und durch den Proteinsequenator bestimmt. Bei der Untersuchung mit der Dansyl-Edman-Methode konnten nur die beiden N-terminalen Aminosäuren bestimmt werden, da das Restpeptid bei der Extraktion nicht in der wäßrigen Phase blieb sondern sich in der Butylessigester-Phase löste. Dies ist offensichtlich durch den hohen Anteil an hydrophoben Seitenketten bedingt.

T3a Gly-Val-Gly-Lys

Die Primärstruktur dieses Peptids konnte durch den Dansyl-Edman-Abbau geklärt werden. Das Ergebnis wurde durch die am Peptid T3 gewonnenen Ergebnisse sowie durch den Proteinsequenator gestützt.

T4 Thr-Arg

Die Sequenz von T4 ergab sich aus der Analyse und der Spezifität des Trypsins, und sie wurde durch den Dansyl-Edman-Abbau und den Proteinsequenator bestätigt.

T5 Ser-Lys

Die Primärstruktur war durch die Analyse und die Spezifität des Trypsins gegeben, und sie wurde zusätzlich durch den Dansyl-Edman-Abbau und den Proteinsequenator bestimmt.

T6 Ala-Ile-Leu-Ala-Ala-Ala-Gly-Ile-Ala-Glu-Asp-Val-Lys

Die Aminosäuresequenz dieses großen tryptischen Peptids wurde durch mehrmalige Analyse auf dem Festphasen-Peptidsequenator bestimmt und durch den Proteinsequenator bestätigt. Die vier N-terminalen Aminosäuren konnten auch durch den Dansyl-Edman-Abbau bestimmt werden.

T7 Ile-Ser-Glu-Leu-Ser-Glu-Gly-Gln-Ile-Asp-Thr-Leu-Arg

Die Primärstruktur dieses Peptids wurde mit dem Festphasen-Peptidsequenator und durch den Dansyl-Edman-Abbau bestimmt. In einer Reihe von Positionen ergaben sich auch Übereinstimmungen mit der vom Proteinsequenator festgestellten Sequenz.

T8 Asp-Glu-Val-Ala-Lys

Dieses Peptid wurde mit Hilfe der Dansyl-Edman-Methode sequenziert. Auch hier ergaben sich Übereinstimmungen mit der vom Proteinsequenator festgestellten Sequenz.

T7+8 Ile-Ser-Glu-Leu-Ser-Glu-Gly-Gln-Ile-Asp-Thr-Leu-Arg-Asp-Glu-Val-Ala-Lys

Das ditryptische Peptid T7+8 wurde mit Hilfe der Dansyl-Edman-Methode sequenziert. Da es nur in geringer Menge vorlag, war die Identifizierung der C-terminalen Aminosäuren schwierig.

T9 Phe-Val-Val-Glu-Gly-Asp-Leu-Arg

Dieses Peptid wurde ausschließlich mit dem Festphasen-Peptidsequenator sequenziert. Zusätzlich wurden die drei N-terminalen Aminosäuren mit der Dansyl-Edman-Methode identifiziert.

Das N-terminale Phenylalanin reagierte im Festphasen-Peptidsequenator offensichtlich mit Methylisothiocyanat zu einem Phenylalanin-Derivat, das dann bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Dünnschichtplatten einen erheblich höheren Rf-Wert aufwies. Durch Auskratzen dieses Fleckes, Elution und Rückspaltung konnte eindeutig sichergestellt werden, daß es sich um Phenylalanin handelt.

T10 Arg

Das Vorhandensein von T10 an insgesamt drei Stellen in der Sequenz ergab sich aus Vergleichen mit den überlappenden Peptiden, die nach Spaltungen von S13 mit anderen Enzymen (*Staphylococcus aureus* Protease und Thermolysin) erhalten wurden.

T11 Glu-Ile-Ser-Met-Ser-Ile-Lys

Das tryptische Peptid T11 wurde mit dem Dansyl-Edman-Abbau und mit dem Festphasen-Peptidsequenator sequenziert. Es konnte allerdings nicht völlig von Verunreinigungen durch T12 gereinigt werden.

T12 Leu-Met-Asp-Leu-Gly-Cys-Tyr-Arg

Dieses Peptid konnte nicht vollkommen von T11 getrennt werden.

Das Peptid wurde mit der Dansyl-Edman-Methode und mit dem Festphasen-Peptidsequenator sequenziert. Das Cystein in Position 84 konnte nur indirekt bestimmt werden, da es weder als Dansyl-Cystein noch als PTH-Derivat identifizierbar war. In der Aminosäurenanalyse von T12 wurde das Cystein (als Cysteinsäure nach Oxidation mit Perameisensäure) bestimmt. Ein positiver Nachweis für das Cystein in Position 84 konnte durch ein überlappendes Thermolysin-Peptid (TH 22) mit C-terminalem Lysin erbracht werden. Die Dansylierung der Cysteinsäure führte zu keinem Ergebnis.

T13 Gly-Leu-Arg

Hinweise auf die Primärstruktur dieses Peptids ergaben sich schon durch die Spezifität des Trypsins, die Aminosäurenanalyse und die gelbe Färbung des Peptids nach Besprühen mit Ninhydrin, was auf N-terminales Glycin hindeutet. Das Peptid wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

T14 His-Arg

Bei diesem Peptid erübrigte sich die Sequenzierung, da die Primärstruktur sich schon aus der Spezifität des Trypsins und aus der Aminosäurenanalyse ergab. Das Peptid wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

T15 Gly-Leu-Pro-Val-Arg

Das Peptid T15 wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

T16 Gly-Gln-Arg

Dieses Peptid wurde ebenfalls nur mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert. Das Glutamin wurde zweifelsfrei als PTH-Derivat nach Konvertierung des PTC-Derivats identifiziert.

T17 Thr-Lys

Bei diesem Peptid war die Primärstruktur schon durch die Aminosäurenanalyse und die Spezifität des Trypsins gegeben. Es wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

T18 Thr-Asn-Ala-Arg

Dieses Peptid wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert und das Asparagin zweifelsfrei als PTH-Derivat nachgewiesen.

T19 Lys

Das Vorhandensein von Lysin in Position 109 und 117 ergab sich aus dem Vergleich mit überlappenden Peptiden aus anderen Spaltungen und vor allem durch die Analyse der ditryptischen Peptide T19+20 und T21+19.

T20 Gly-Pro-Arg

Bei dem Peptid T20 ergab sich die Sequenz schon aus der Gelbfärbung nach Besprühen mit Ninhydrin-Reagenz, aus der Aminosäurenanalyse und aus der Trypsin-Spezifität. Es wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

T19+20 Lys-Gly-Pro-Arg

Dieses ditryptische Peptid konnte bei jeder tryptischen Spaltung isoliert und mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert werden. Das N-terminale Lysin wurde durch Rückspaltung des PTC-Derivats identifiziert.

T21 Lys-Pro-Ile-Lys

Dieses Peptid wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert. Bei jedem Abbauschritt wurde eine Rückspaltung des PTC-Derivats zur eindeutigen Identifizierung der Aminosäuren durchgeführt.

T21+19 Lys-Pro-Ile-Lys-Lys

Dieses ditryptische Peptid wurde genauso wie T21 durch Dansyl-Edman-Abbau und Rückspaltung der PTC-Derivate sowie teilweise durch den Festphasen-Peptidsequenator sequenziert.

6.4. Tryptische Spaltung nach Blockierung der Argininreste

Diesem Versuch lag die Überlegung zugrunde, daß die schwierige Zuordnung der vielen kleinen tryptischen Peptide durch eine Blockierung der Argininreste und nachfolgende tryptische Spaltung nur am Lysin erleichtert werden könnte.

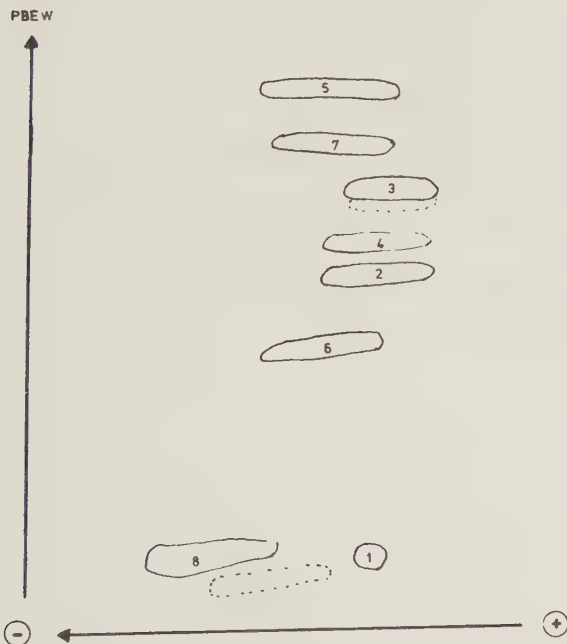
Während ein Vorversuch mit einer geringen Menge an Protein S13, die für die Anfertigung von drei Peptidkarten ausreichte, auf die Wirksamkeit der Blockierung hindeutete, wurden bei dem Großansatz nur die normalen tryptischen Peptide erhalten; die Blockierung war also unwirksam. Es ist denkbar, daß das Trypsin während der Deblockierung der Argininreste in 0,5 M Hydroxylamin noch aktiv war und die Spaltung an den Argininen nachträglich bewirkte. Das würde bedeuten, daß zwar die Blockierung an sich wahrscheinlich wirksam war, aber das Trypsin nach der Spaltung nicht ausreichend inaktiviert worden war.

7. Spaltung mit *Staphylococcus aureus* Protease

7.1. Peptidkarte der Peptide

Es wurden jeweils ca. 10-15 mg Protein mit *Staphylococcus aureus* Protease gespalten. Das Enzym spaltet bei pH 4,3 spezifisch an der Carboxylgruppe von Glutaminsäureresten. Die Peptidkarte der Peptide ist in der Abbildung 12 zusammen mit der Zuordnung der Peptide wiedergegeben.

Abbildung 12: Peptidkarte und Zuordnung der Peptide von der Spaltung mit *Staphylococcus aureus* Protease



7.2. Trennung der Peptide

Die Spaltprodukte der Spaltung mit *Staphylococcus aureus* Protease wurden in einem Fall auf einer Sulfoäthylzellulose-Säule getrennt. Dabei wurden aber nicht alle Peptide in voller Ausbeute erhalten; vor allem die großen Peptide SP 1, SP 7 und SP 8 wurden nur in geringer Menge eluiert.

Bei einem späteren Ansatz wurde das Material nach der Spaltung auf eine Sephadex G 50 (superfine)-Säule gegeben, und auf diese Weise konnten die großen Peptide SP 1 und SP 8 von den restlichen Peptiden bereits sehr gut abgetrennt werden. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 13 wiedergegeben. Interessanterweise wurde das SP (35 Aminosäurereste) immer vor dem SP 1 eluiert (40 Reste). Tatsächlich ist das Molekulargewicht von SP 8 um ca. 150 Dalton höher als das von SP 1, was durch den hohen Anteil an Lysin und Arginin in SP 8 bedingt ist. Während die Peptide SP 1 und SP 8 zum Teil direkt aus der Fraktion ohne weitere Reinigung zur Sequenzanalyse benutzt werden konnten, mußten die restlichen Fraktionen durch Dünnschichtchromatographie nachgetrennt werden.

Die Aminosäurezusammensetzungen der SP-Peptide sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Abbildung 13: Trennung der SP - Peptide auf Sephadex G 50 (superfine)

Spaltung von Protein S13 mit
Staphylococcus aureus Protease
Sephadex G 50 superfine, 145 x 1 cm, 10% Essigsäure

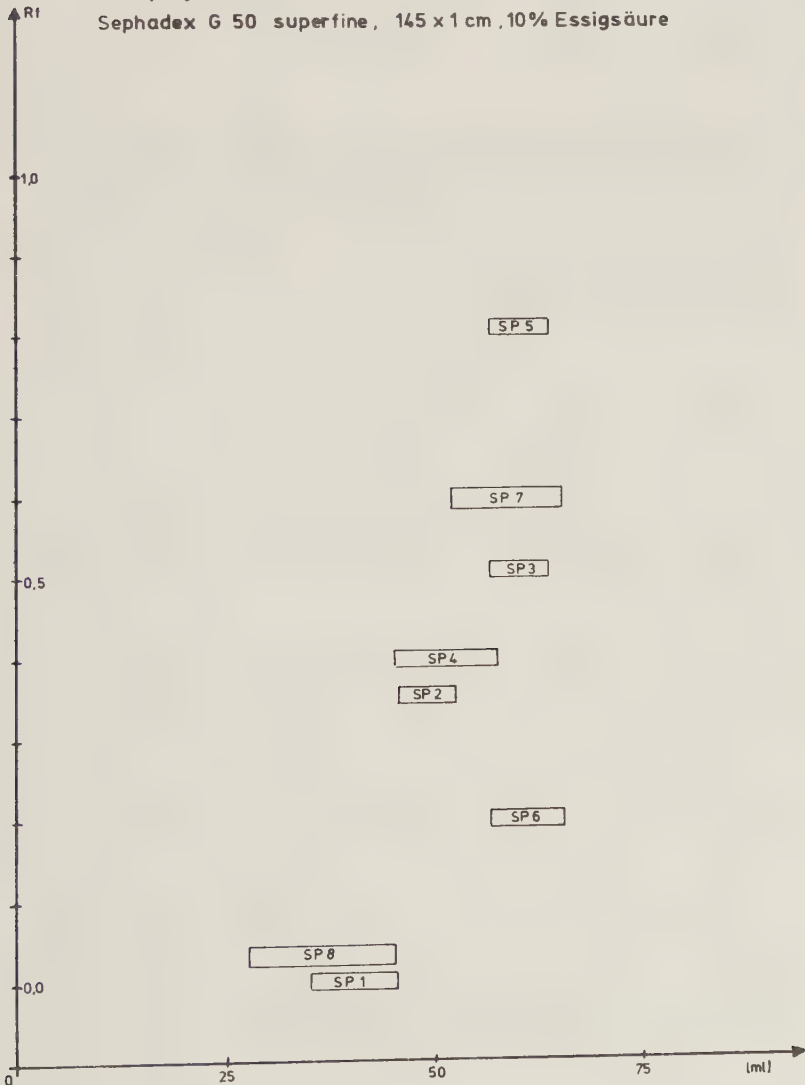


Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzungen der Peptide von der Spaltung von S13 mit Staphylococcus aureus Protease

Position	1-40	29-40	41-46	47-49	50-58	59-65	66-71	72-81	82-117	72-77	72-78	79-81	78-81
Name	SP1	SP1a	SP2	SP3	SP3+4	SP4	SP5	SP6	SP7	SP7/1	SP7/2	SP7/3	SP7/4
Cys													
Asx	2.00		0.66		1.95	2.16		1.08	1.13			1.00	1.39
Thr	1.84				1.00	1.07							
Ser	1.71	0.91	0.97	0.79	1.31				1.77		1.18		
Glx	1.11	1.64	1.17	1.00	3.73	2.67	1.41	1.44		1.58			
Pro	1.03												
Gly	4.00	1.27			2.07	1.22		1.11					
Ala	8.19 ^a	5.06					1.00						
Val	1.81		1.06				2.63						
Met													
Ile	5.93 ^b	1.95	1.00		0.87	1.05			1.76	0.40	0.81	0.74	0.33
Leu	2.03	1.00		0.77 ^a	1.70 ^a	1.21		1.00	2.09	1.81	1.98		
Tyr	0.73								1.16			0.71 ^a	1.05
Phe							0.84						
His	1.85												
Lys	2.85	1.07	0.99				0.82 ^c		0.88 ^c	1.00	0.98		
Arg	2.12				0.71 ^c	1.00		1.95	1.00		1.00		1.00

Unkorrigierte Werte nach 20-stündiger Hydrolyse

a) N-terminale Aminosäure, gefärbt mit Ninhydrin-Reagenz auf der Dünnenschichtplatte

b) niedriger Wert aufgrund von unvollständiger Hydrolyse

c) niedriger Wert nach Färbung mit Ninhydrin-Reagenz auf der Dünnenschichtplatte

d) bestimmt als Cysteinsäure nach Oxidation mit Perameisensäure

7.3. Sequenzierung der Peptide

Durch die Sequenzierung der SP-Peptide konnten wichtige Rückschlüsse auf die Reihenfolge der bereits bekannten tryptischen Peptide gezogen werden. Außerdem wurden die gefundenen Sequenzen für die tryptischen Peptide durch die Sequenzierung überlappender Bruchstücke bestätigt.

SP 1 Ala-Arg-Ile-Ala-Gly-Ile-Asn-Ile-Pro-Asp-His-Lys-His-Ala-Val-Ile-Ala-Leu-Thr-Ser-Ile-Tyr-Gly-Val-Gly-Lys-Thr-Arg-Ser-Lys-Ala-Ile-Leu-Ala-Ala-Ala-Gly-Ile-Ala-Glu

Dieses große N-terminale SP-Peptid konnte aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung und seiner N-terminalen Aminosäure bereits charakterisiert werden, zumal der N-terminale Bereich des Proteins und die entsprechenden tryptischen Peptide schon mit dem Proteinsequenator und den anderen Methoden sequenziert worden waren. Dennoch wurde dieses SP-Peptid mit dem Festphasen-Peptidsequenator bis zur Aminosäure in Position 27 durchsequenziert. Die Resultate stimmten mit der bereits bekannten N-terminalen Sequenz von S13 überein.

SP 1a Ser-Lys-Ala-Ile-Leu-Ala-Ala-Ala-Gly-Ile-Ala-Glu

Dieses Peptid wurde in etwas geringerer Ausbeute nur bei einer der Spaltungen mit Staphylococcus aureus Protease erhalten und mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert. Offensichtlich beruht das Auftreten dieses Peptids auf einer tryptischen Nebenaktivität im Enzympräparat.

SP 2 Asp-Val-Lys-Ile-Ser-Glu

Das Peptid SP 2 wurde mit Hilfe der Dansyl-Edman-Methode und mit dem Festphasen-Peptidsequenator sequenziert. Die Asparaginsäure in N-terminaler Position wurde als PTH-Asp eindeutig bestimmt.

SP 3 Leu-Ser-Glu

Dieses Peptid wurde ebenfalls sowohl mit der Dansyl-Edman-Methode als auch mit dem Festphasen-Peptidsequenator sequenziert.

SP 4 Gly-Gln-Ile-Asp-Thr-Leu-Arg-Asp-Glu

Das Peptid SP 4 wurde ausschließlich mit dem Festphasen-Peptidsequenator sequenziert.

SP 3+4 Leu-Ser-Glu-Gly-Gln-Ile-Asp-Thr-Leu-Arg-Asp-Glu

Dieses Peptid wurde nur bei einer der Spaltungen von S13 mit Staphylococcus aureus Protease in etwas geringerer Ausbeute erhalten und mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

SP 5 Val-Ala-Lys-Phe-Val-Val-Glu

Dieses Peptid wurde ausschließlich mit dem Festphasen-Peptidsequenator sequenziert.

SP 6 Gly-Asp-Leu-Arg-Arg-Glu

Dieses Peptid wurde sowohl mit dem Festphasen-Peptidsequenator als auch mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

SP 7 Ile-Ser-Met-Ser-Ile-Lys-Arg-Leu-Met-Asp

Das Peptid SP 7 wurde nur mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert. Zusätzlich wurde dieses Peptid mit TPCK-Trypsin nachgespalten. Dabei traten die folgenden Peptide auf:

SP 7 / 1 Ile-Ser-Met-Ser-Ile-Lys

SP 7 / 2 Ile-Ser-Met-Ser-Ile-Lys-Arg

SP 7 / 3 Arg-Leu-Met-Asp

SP 7 / 4 Leu-Met-Asp

Die vier Peptide wurden dünnschichtchromatographisch getrennt und mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert. Lysin und Arginin wurden durch Rückspaltung der PTC-Derivate und die Asparaginsäure als PTH-Asp eindeutig bestimmt.

SP 8 Leu-Gly-Cys-Tyr-Arg-Gly-Leu-Arg-His-Arg-Arg-Gly-Leu-Pro-
Val-Arg-Gly-Gln-Arg-Thr-Lys-Thr-Asn-Ala-Arg-Thr-Arg-Lys-
Gly-Pro-Arg-Lys-Pro-Ile-Lys-Lys

Zunächst wurde versucht, dieses Peptid mit der Dansyl-Edman-Methode zu sequenzieren. Dabei traten Probleme mit der Löslichkeit des Peptids in der wäßrigen Phase auf, was dazu führte, daß mit Sicherheit nur die Aminosäuren im N-terminalen Bereich (die ersten 5 Aminosäuren ohne Cys und nach 5 unklaren Positionen weitere 5 Aminosäuren) bestimmt werden konnten. Daraufhin wurde zweimal versucht, das Peptid mit dem Festphasen-Peptidsequenator zu sequenzieren, was aber bei den beiden Versuchen nicht gelang. Offensichtlich war das Peptid immer nur in sehr geringem Maße an das Harz gekuppelt worden. So konnten auf diesem Wege nur die ersten zwei N-terminalen Aminosäuren bestimmt werden; das Cystein war nicht nachweisbar, dafür aber noch das Tyrosin.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde das Peptid SP 8 mit Thermo-lysin nachgespalten. Dabei traten die folgenden Peptide auf:

SP 8 / 1 Leu-Gly-Cys
SP 8 / 2 Tyr-Arg-Gly
SP 8 / 3 Leu-Arg-His-Arg-Arg-Gly-Leu-Pro
SP 8 / 4 Val-Arg-Gly-Gln-Arg-Thr-Lys-Thr-Asn-Ala-Arg-Thr-Arg-
Lys-Gly-Pro-Arg-Lys-Pro
SP 8 / 5 Ile-Lys-Lys

Die wurden alle dünnenschichtchromatographisch isoliert und mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

P 8 / 1 Das Cystein wurde als Cysteinsäure nach Oxidation mit dem Aminosäurenanalysator identifiziert. Die Dansylierung von Cysteinsäure führte zu keinem positiven Resultat.

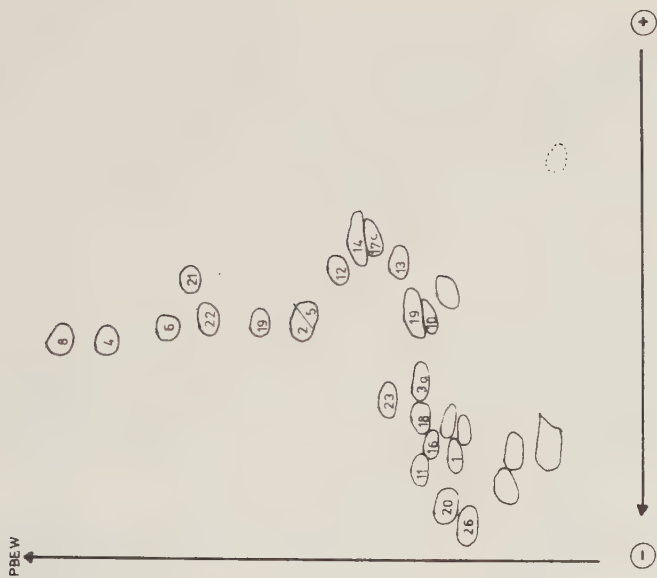
- SP 8 / 2 Das Arginin wurde durch Rückspaltung des PTC-Derivats identifiziert.
- SP 8 / 3 Histidin und Arginin wurden durch Rückspaltung der PTC-Derivate eindeutig identifiziert.
- SP 8 / 4 Von jedem Abbauschritt wurde eine Rückspaltung der PTC-Derivate (beziehungsweise beim Vorliegen von Asx/Glx eine Konvertierung zum PTH-Derivat) durchgeführt.
- SP 8 / 5 Die Lysine wurden durch Rückspaltung der PTC-Derivate eindeutig identifiziert.

8. Spaltung mit Thermolysin

Thermolysin spaltet vorwiegend an der Aminogruppe der Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Valin und Phenylalanin. Bei dem Ansatz zur Isolierung und Sequenzierung der Peptide traten auch Spaltungen am Alanin, Methionin und Tyrosin auf.

8.1. Peptidkarte der Thermolysin-Peptide

Die Peptidkarte mit den Thermolysin-Peptiden ist in der Abbildung 1 gezeigt und die Zuordnung der Peptide ist in Abbildung 15 schematisch wiedergegeben.



8.2. Trennung der Peptide

Das Material wurde nach der Spaltung direkt auf eine Säule, die mit Dowex M71 Ionenaustauscherharz gefüllt war, gegeben, und die Peptide wurden alle dünnschichtchromatographisch nachgetrennt. Von dieser Säule konnten alle Peptide mit Ausnahme von TH 24 und TH 25 eluiert werden. Diese beiden Peptide waren offensichtlich aufgrund ihrer hohen Basizität in der Säule hängengeblieben. Sie wurden dann durch Nachspaltung der SP-Peptids SP 8 mit Thermolysin erhalten und dünnschichtchromatographisch getrennt (vgl. Kapitel 3.7.3.). Das Auftreten der Peptide TH 25a und TH 25c ist auf unspezifische Spaltungen am Glycin (Position 93) beziehungsweise am Asparagin (Position 104) zurückzuführen.

Die Aminosäurezusammensetzungen der Thermolysin-Peptide sind in der Tabelle 5 und das Elutionsprofil der Dowex-Säule in der Abbildung 16 wiedergegeben.

Spaltung von Protein S13 mit Thermolysin

Dowex M71 Elution mit Gradienten aus Pyridin/Ameisensäure

Fractionen 1 - 7 : 0,2 M Pyridin/Ameisensäure, pH 2,7

Fractionen 8 - 174 : 0,2 M Pyr/Ameisensäure, pH 2,7 - 1,0 M Pyr/Ameisensäure, pH 3,5

Fractionen 175-365 : 1,0 M Pyr/Ameisensäure, pH 3,5 - 2,0 M Pyr/Ameisensäure, pH 5,0

Fractionen 366-380 : 0,1 N NaOH

Säulenmaße : 0,2 x 10 cm : 0,16 ml/Minute

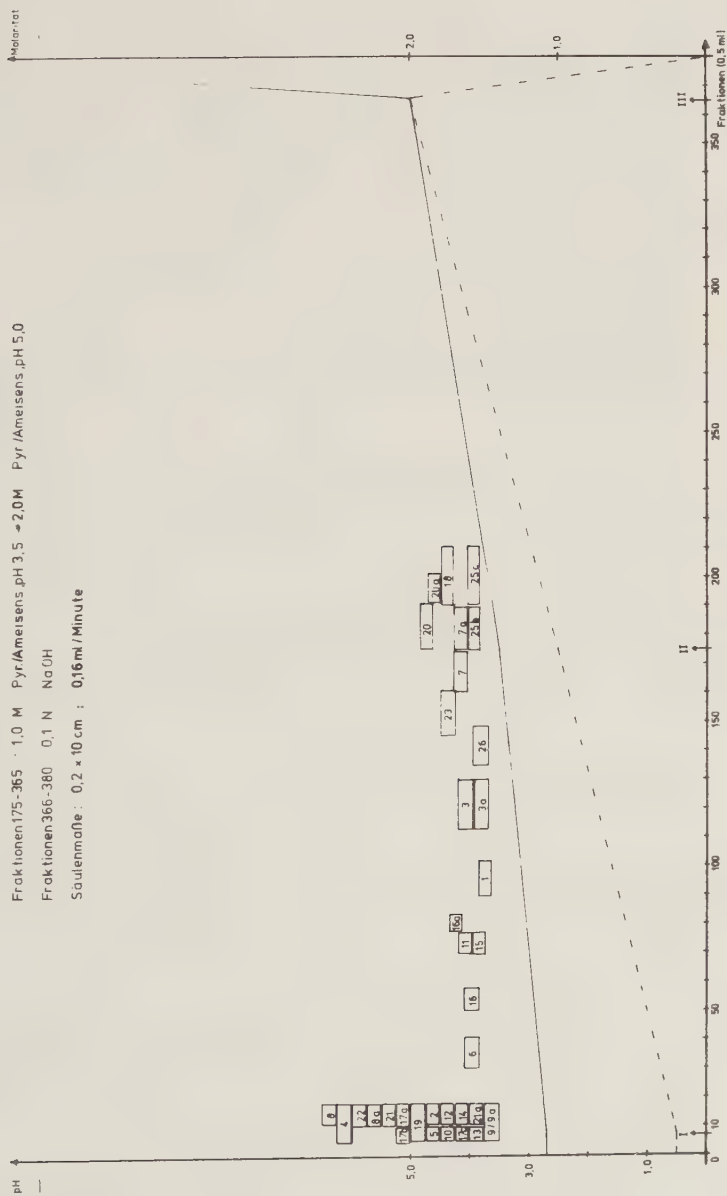


Tabelle 5: Aminosäurenanalysen der Thermolysin-Peptide

Position	1-2	3-5	6-14	6-13	15-17	18-20	21-23	24-31	24-30	32-34	31-33	35-37 47-51	36-37
Name	TH1	TH2	TH3	TH3a	TH4	TH5	TH6	TH7	TH7a	TH8	TH8a	TH9/13	TH9a
Cys													
Asx			1,99	2,00									
Thr						0,95		0,96	1,06				
Ser						0,86		0,79	0,81			0,72	
Glx												2,00	
Pro			1,00	1,00									
Gly		1,00					1,00	1,02	1,00			2,00	1,00
Ala	0,75 ^b	1,00	1,08		1,00			1,05		1,11	0,96	1,88	1,03
Val					0,69 ^b			0,95	0,81				
Met													
Ile		0,86 ^b	2,04	1,97	0,73		0,84 ^b			0,86 ^b	0,87		
Leu						1,18				1,00	1,00	0,59	
Tyr							0,68						
Phe													
His			1,64	1,72									
Lys			1,05	0,89				1,72	1,71				
Arg	1,00							1,00	1,27				

Position	38-41	42-43	44-46	47-51	52-54	55-58	59-61	59-62	62-67	62	63-67	64-67 63-67 TH17c	68-71
Name	TH10	TH11	TH12	TH13	TH14	TH15	TH16	TH16a	TH17	TH17a	TH17b	TH17c	TH18
Cys													
Asx	1,00				1,00	1,19			1,00		1,00	0,94	
Thr					0,88								
Ser			0,83	0,81									
Glx	1,12		1,37	2,22		1,43			1,19		1,24	1,00	1,11
Pro													
Gly				1,00					1,02		1,10	1,43	
Ala	1,16						1,00	1,00					
Val		0,90					1,09	0,93	2,00		2,22	1,24	
Met													
Ile	0,47 ^b		1,00		0,52 ^b								
Leu				0,74 ^b		0,68 ^b							0,66 ^b
Tyr													
Phe								0,95	0,65 ^b	1			
His													
Lys							0,95	0,79					
Arg		1,00				1,00							2,00

Position	72-75	76-78	76-79	79-81	80-81	82-84	85-87	88-95	96-114	96-104	96-103	115-117
Name	TH19	TH20	TH20a	TH21	TH21a	TH22	TH23	TH24	TH25	TH25b	TH25c	TH26
Cys						1 ^b						
Asn				1.00	1.00					1.13	1.10	
Thr									2.61	1.97	1.86	
Ser	1.46											
Glx									1.24	1.26	1.02	
Pro								1.00	2.16			
Gly						1.00	1.37	1.38	2.24	1.18	1.10	
Ala									1.09			
Val									0.97	0.75 ^a	0.65 ^a	
Met	1.00			0.68	0.58 ^a							
Ile	1.08	0.88 ^a	0.90									0.86 ^a
Leu			1.13	0.69 ^a		0.80 ^a		1.21 ^a				
Tyr							0.41 ^a					
Phe												
His									0.94			
Lys		0.93	0.81						2.86	0.93	0.78	2.00
Arg		1.00	1.00				1.00	2.72	5.00	2.00	2.00	

Unkorrigierte Werte nach 20-stündiger Hydrolyse

a) N-terminale Aminosäure, gefärbt mit Ninhydrin-Reagenz auf der Dünnschichtplatte

b) bestimmt als Cysteinsäure nach Oxidation mit Perameisensäure

8.3. Sequenzierung der Peptide

Bei den meisten Thermolysin-Peptiden ergab sich die Primärstruktur bereits aus der Aminosäurenzusammensetzung, der Spezifität des Thermolysins und durch den Vergleich mit den bereits sequenzierten tryptischen und SP-Peptiden. Nur in den Fällen, in denen die Zuordnung der Peptide noch ungeklärt war (C-terminaler Bereich von S13), und bei Peptiden mit gleicher Zusammensetzung aber verschiedener Sequenz wurde die Aminosäuresequenz mit der Dansyl-Edman-Methode bestimmt.

TH 1 Ala-Arg

TH 2 Ile-Ala-Gly

TH 3 Ile-Asn-Ile-Pro-Asp-His-Lys-His-Ala

TH 3a Ile-Asn-Ile-Pro-Asp-His-Lys-His

TH 4 Val-Ile-Ala

Bei diesem Peptid wurde die N-terminale Aminosäure bestimmt, um sicherzustellen, daß es sich nicht um das ebenfalls mögliche Peptid Ala-Val-Ile handelt.

TH 5 Leu-Thr-Ser

TH 6 Ile-Tyr-Gly

TH 7 Val-Gly-Lys-Thr-Arg-Ser-Lys-Ala

Dieses Peptid wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert; Lysin und Arginin wurden durch Rückspaltung der PTC-Derivate eindeutig identifiziert.

TH 7a Val-Gly-Lys-Thr-Arg-Ser-Lys

Dieses Peptid wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

TH 8 Ile-Leu-Ala

TH 8a Ala-Ile-Leu

Die beiden Peptide TH 8 und TH 8a konnten dünnschichtchromatographisch voneinander getrennt werden, und sie wurden dann mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

TH 9 Ala-Ala-Gly

TH 9a Ala-Gly

Diese beiden Peptide wurden als Gemisch zusammen mit dem Peptid TH 13 erhalten und gemeinsam durch Dansyl-Edman-Abbau sequenziert.

TH 10 Ile-Ala-Glu-Asp

TH 11 Val-Lys

TH 12 Ile-Ser-Glu

TH 13 Leu-Ser-Glu-Gly-Gln

Dieses Peptid wurde als Gemisch zusammen mit TH 9 und TH 9a erhalten und mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

TH 14 Ile-Asp-Phe

TH 15 Leu-Arg-Asp-Glu

TH 16 Val-Ala-Lys

TH 16a Val-Ala-Lys-Phe

Bei diesem Peptid wurde die N-terminale Aminosäure zur Unterscheidung von dem Peptid Ala-Lys-Phe-Val (Position 60-63) bestimmt.

TH 17 Phe-Val-Val-Glu-Gly-Asp

TH 17a Phe

TH 17b Val-Val-Glu-Gly-Asp

TH 17c Val-Glu-Gly-Asp

TH 18 Leu-Arg-Arg-Glu

Dieses Peptid wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert, und die Arginine wurden durch Rückspaltung der PTC-Derivate eindeutig identifiziert. Die Glutaminsäure wurde als PTH-Glu bestimmt.

PH 19 Ile-Ser-Met-Ser

PH 20 Ile-Lys-Arg

PH 20a Ile-Lys-Arg-Leu

Die beiden Peptide PH 20 und PH 20a wurden mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert und Lysin und Arginin durch Rückspaltung der PTC-Derivate eindeutig bestimmt.

PH 21 Leu-Met-Asp

PH 21a Met-Asp

PH 22 Leu-Gly-Cys

Bei diesem Peptid wurden die ersten zwei Stufen mit dem Dansyl-Edman-Abbau sequenziert und das freie Cystein zur Cysteinsäure oxidiert und direkt auf dem Aminosäurenanalysator nachgewiesen. Die Dansylierung von Cysteinsäure brachte kein Resultat.

PH 23 Tyr-Arg-Gly

Dieses Peptid wurde mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert und das Arginin durch Rückspaltung des PTC-Derivats identifiziert.

PH 24 Leu-Arg-His-Arg-Arg-Gly-Leu-Pro

Dieses Peptid wurde ebenfalls mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert und Histidin und Arginin jeweils durch Rückspaltung der PTC-Derivate identifiziert.

PH 25 Val-Arg-Gly-Gln-Arg-Thr-Lys-Thr-Asn-Ala-Arg-Thr-Arg-Lys-Gly-Pro-Arg-Lys-Pro

Dieses Peptid wurde durch Nachspaltung von dem SP-Peptid SP 8 erhalten und mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert. Von jedem Abbauschritt wurde eine Rückspaltung des zugehörigen PTC-Derivats beziehungsweise bei Asparagin die Konvertierung zum PTH-Asn) durchgeführt.

TH 25a Gly-Leu-Pro-Val-Arg-Gly-Gln-Arg-Thr-Lys-Thr-Asn-Ala-Arg-
Thr-Arg-Lys-Gly-Pro-Arg-Lys-Pro

Dieses Peptid wurde als Verunreinigung bei der Sequenzierung des Peptids TH 25 festgestellt.

TH 25b Val-Arg-Gly-Gln-Arg-Thr-Lys-Thr-Asn

Dieses Peptid wurde von der Dowex M71 Säule eluiert und mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert. Lysin und Arginin wurden durch Rückspaltung, Glutamin durch Konvertierung des PTC-Derivats nachgewiesen.

TH 25c Val-Arg-Gly-Gln-Arg-Thr-Lys-Thr

Dieses Peptid wurde ebenfalls von der Dowex-Säule eluiert und mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert.

TH 26 Ile-Lys-Lys

Auch dieses Peptid wurde von der Dowex-Säule eluiert , mit der Dansyl-Edman-Methode sequenziert und Lysin durch Rückspaltung des PTC-Derivats eindeutig identifiziert.

9. Spaltung mit Chymotrypsin

Chymotrypsin spaltet vorwiegend am Carboxylende aromatischer Aminosäuren, besitzt aber meist eine Reihe von Nebenaktivitäten.

9.1. Peptidkarte der chymotryptischen Peptide

Die Spaltung von S13 mit Chymotrypsin wurde zunächst nur als Kleinansatz für die Anfertigung von Peptidkarten durchgeführt. Aufgrund der relativ schlechten Trennung der Peptide auf der Peptidkarte (Abbildung 17) wurde darauf verzichtet, einen Großansatz zur präparativen Isolierung der Peptide durchzuführen. Stattdessen wurden nur die charakteristischsten Flecken aus den Peptidkarten eluiert und analysiert. Der größte Teil der analysierten Peptide konnte aufgrund der Aminosäurenanalysen identifiziert werden. Die Zuordnung der Peptide auf der Peptidkarte ist in der Abbildung 18 dargestellt, und die Aminosäurezusammensetzungen der identifizierten Peptide sind in der Tabelle 6 zusammengestellt.

Abbildung 17: Peptidkarte der chymotryptischen Peptide

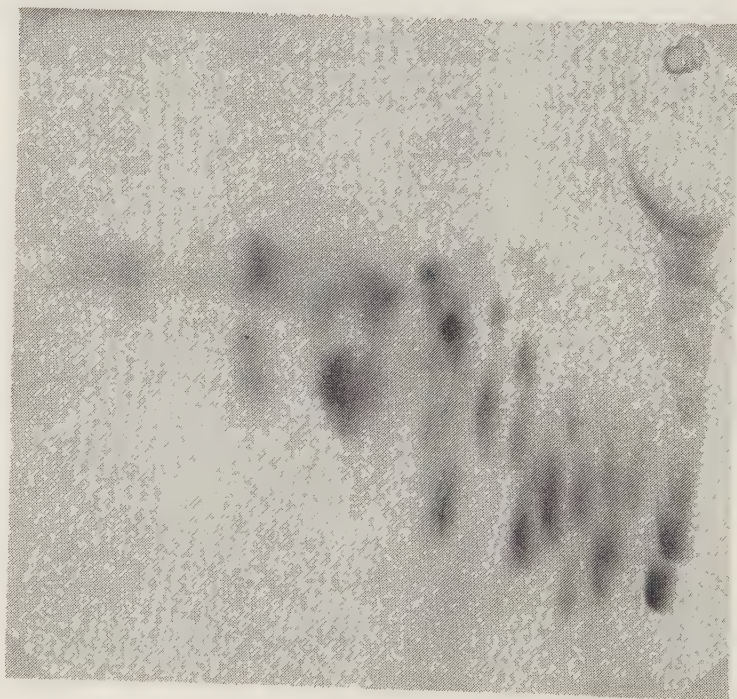
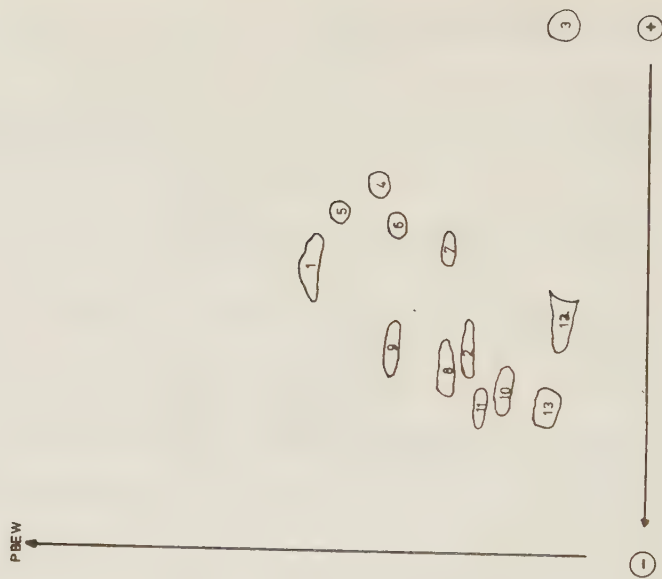


Abbildung 18: Zuordnung der chymotryptischen Peptide



Position	1-18	23-28	34-47	48-62	63-69	63-70	71-78	75-78	86-89	89-92	90-91	103-117	109-117
Name	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10	CH11	CH12	CH13
Cys													
Asx	2.11		1.01	2.00	1.11	1.05						0.71	
Thr		0.97		0.92								1.69 ^a	
Ser			0.79	0.85 ^a									
Glx			2.01	3.33	1.37	1.26	1.69	0.84 ^a					
Pro	1.06						1.28						
Gly	1.48	1.69 ^a	0.91	1.38	1.15	1.17			1.20			2.00	2.00
Ala	3.70 ^a		4.00	1.20								1.63	1.14
Val	0.98	1.00	0.76	0.91	1.34 ^a	1.47 ^a						1.15	
Met							0.83						
Ile	3.61 ^b		1.51 ^c	0.93			1.85	1.00				0.83	0.92
Leu	1.57		1.16	0.92	1.00	0.95			1.00				
Tyr													
Phe				0.69									
His	2.00									1.00	0.70 ^a		
Lys	0.81 ^b	0.86 ^b	1.00	0.80			1.00	0.98				4.27	3.59 ^a
Arg	1.25	1.16		0.91	0.94	2.00	1.16	1.25	1.70 ^a	2.75 ^a	1.00	3.01	1.01

1
0
1

Unkorrigierte Werte nach 20-stündiger Hydrolyse

a) N-terminale Aminosäure, gefärbt mit Ninhydrin-Reagenz auf der Dünnschichtplatte

b) niedriger Wert nach Färbung mit Ninhydrin-Reagenz auf der Dünnschichtplatte

c) niedriger Wert aufgrund von unvollständiger Hydrolyse

10. Spaltung mit Carboxypeptidasen

Zur Identifizierung der Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Proteins S13 wurden Spaltungen mit Carboxypeptidasen durchgeführt. Dabei wurden die C-terminalen Aminosäuren stufenweise vom C-Terminus her abgespalten.

10.1. Spaltung mit Carboxypeptidasen A und B

aufgrund der ungünstigen Sequenz (Prolin in Position 114) konnte bei einer Behandlung mit den Carboxypeptidasen A und B nur Lysin als C-terminale Aminosäure festgestellt werden, da diese beiden Carboxypeptidasen kein Prolin abspalten können.

10.2. Spaltung mit Carboxypeptidase C

Durch Behandlung von S13 mit Carboxypeptidase C war es möglich, nach Lysin auch noch Prolin, Isoleucin und Arginin abzuspalten (Abbildung 19). Damit konnte eine weitere Bestätigung für die gefundene Sequenz im C-terminalen Bereich von S13 erbracht werden.

Abbildung 19: Spaltung von Protein S13 mit Carboxypeptidase C

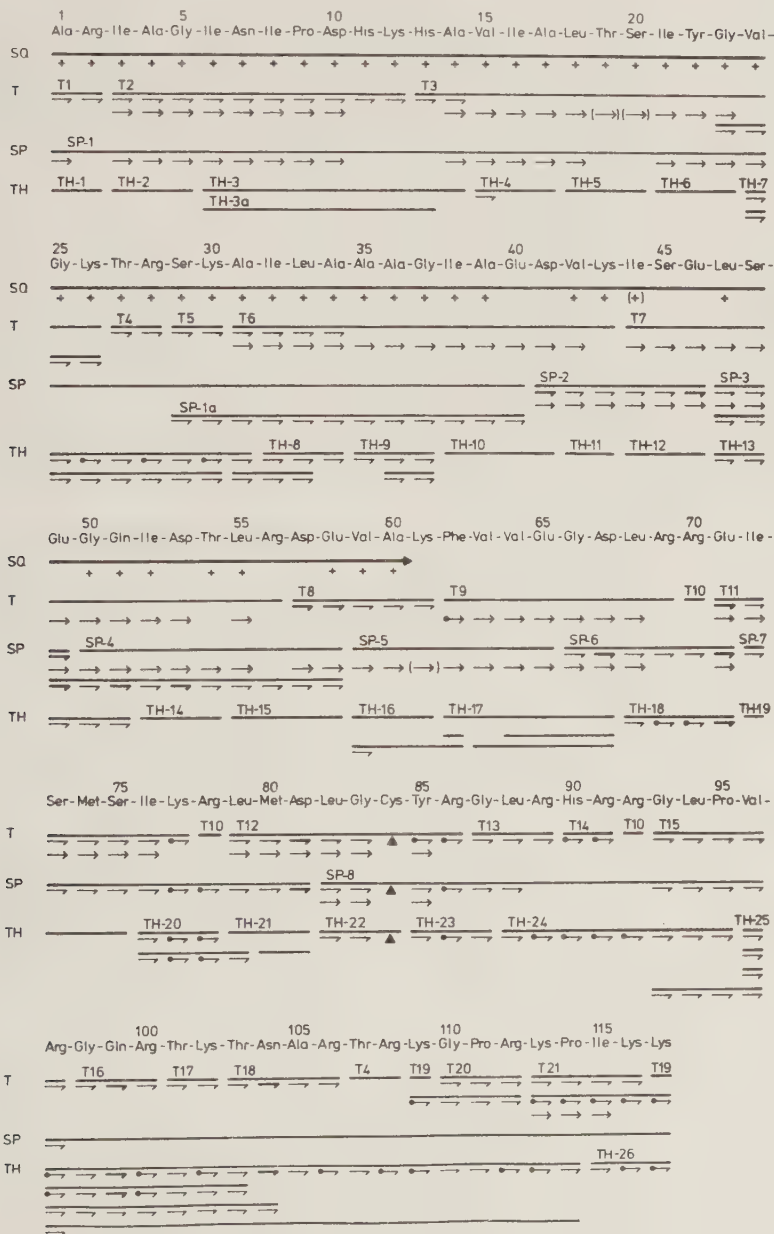


11. Gesamtsequenz des Proteins S13

Die gesamte Sequenz des Proteins S13 ist in der Abbildung 20 zusammen mit allen isolierten Peptiden der verschiedenen Spaltungs-Methoden wiedergegeben. Ebenfalls eingezeichnet ist der Bereich, der mit dem Proteinsequenator sequenziert worden war. Bei den sequenzierten Peptiden ist die jeweilige Methode zur Bestimmung der Primärstruktur durch entsprechende Symbole gekennzeichnet. Die Abbildung 20 erlaubt es, die Aufstellung der Gesamtsequenz durch die Kombination der einander überlappenden Peptidsequenzen nachzuvollziehen.

Die Zuordnung der tryptischen Peptide T1, T2, T3, T4, T5 und T6 ergibt sich aus der mit dem Proteinsequenator festgestellten Sequenz. Der Anschluß an T6 ist gegeben durch das SP-Peptid SP 2, und damit lassen sich das tryptische Peptid T7 und die SP-Peptide SP 2, SP 3 und SP 4 zuordnen. Der Anschluß an T7 wird durch das SP-Peptid SP 4 geklärt, und zum tryptischen Peptid T8 läßt sich wiederum das SP-Peptid SP 5 zuordnen, das gleichzeitig die Stellung von T9 bestimmt. Das tryptische Peptid T9 erlaubt die Zuordnung von SP 6 und das SP-Peptid SP 6 wiederum die Zuordnung von T10 und T11. Die Stellung von SP 7 wird durch das tryptische Peptid T11 festgelegt, und mit Hilfe von SP 7 können die tryptischen Peptide T10 und T12 zugeordnet werden. Die Sequenz von T12 legt die Stellung von SP 8 fest. Da das SP 8 als intaktes SP-Peptid nicht vollständig sequenziert werden konnte, muß von nun an auf die Sequenzen der Thermolysin-Peptide zurückgegriffen werden. Die Stellung des tryptischen Peptids T13 folgt aus der Überlappung mit dem Thermolysin-Peptid TH 23 und den Resultaten, die bei der teilweisen

Abbildung 20: Aminosäuresequenz des Proteins S13



Erläuterungen zu Abbildung 20:

Symbol	Erklärung
SQ	Edman-Abbau des intakten Proteins im verbesserten Beckman-Sequenator mit automatisierter Konvertierungsreaktion
T	Spaltung mit TPCK-Trypsin
SP	Spaltung mit Staphylococcus aureus Protease
TH	Spaltung mit Thermolysin
	Identifizierung der mit dem Beckman-Sequenator erhaltenen PTH-Derivate durch Dünnschichtchromatographie
	Identifizierung der mit dem Festphasen-Peptidsequenator erhaltenen PTH-Derivate durch Dünnschichtchromatographie
	Identifizierung als freie Aminosäure nach Edman-Abbau im Festphasen-Peptidsequenator und Hydrolyse des PTH-Derivats nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung
	Identifizierung als Dansyl-Aminosäure nach Dansyl-Edman-Abbau
	Identifizierung als PTH-Derivat nach Dansyl-Edman-Abbau und Konvertierung des PTC-Derivats
	Identifizierung als freie Aminosäure nach Dansyl-Edman-Abbau und Hydrolyse des PTC- oder PTH-Derivats
	Identifizierung als Cysteinsäure nach Oxidation mit Perameisensäure

Sequenzierung des SP-Peptids SP 8 und des Bromcyan-Peptids erhalten worden waren. Die Zuordnung der tryptischen Peptide T14, T10 und T15 ergibt sich aus der Sequenz des Thermolysin-Peptids TH 24. Die Zuordnung von T15 wurde außerdem noch erleichtert durch die in diesem Bereich erfolgreiche Sequenzierung des SP-Peptids SP 8. Die Stellung der restlichen tryptischen Peptide folgt aus der Sequenz des Thermolysin-Peptids TH 25.

Die Sequenz in den Positionen 108-109 (Arg-Lys) ergibt sich aus der Analyse des ditryptischen Peptids T19+20 sowie aus der Beobachtung, daß das tryptische Peptid T4 (Thr-Arg) auf der Peptidkarte der tryptischen Peptide in etwa doppelter Menge auftritt.

Die C-terminale Sequenz in den Positionen 116-117 (Lys-Lys) folgt aus der Analyse des ditryptischen Peptids T21+19 und des Thermolysin-Peptids TH 26.

Die somit aufgestellte Primärstruktur des ribosomalen Proteins S13 von E. coli steht in sehr guter Übereinstimmung mit der ermittelten Aminosäurezusammensetzung des Proteins.

Auffällig an der Sequenz von S13 ist die Verteilung der sauren und der basischen Aminosäuren. Während mit Ausnahme von Asp in Position 10 alle sauren Aminosäuren im mittleren Teil der Sequenz liegen (Positionen 40-81), treten die basischen Aminosäuren besonders häufig im C-terminalen Drittel auf (Positionen 86-117; ca. 50% basische Aminosäuren).

12. Aussagen über die Sekundärstruktur von S13

Es existieren verschiedene Methoden, um Aussagen über die Sekundärstruktur eines Proteins mit bekannter Aminosäuresequenz machen zu können. Als Grundlage dienen Proteine, deren Primärstrukturen bekannt sind und deren Sekundär- und Tertiärstrukturen mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden sind. Dabei wurden die Aminosäuren hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit, mit der sie eine α -Helix oder eine β -Struktur ausbilden, katalogisiert. Wendet man nun diese empirischen Werte bei den Aminosäuren in der Sequenz von S13 an, so ergeben sich die folgenden Aussagen über eine mögliche Sekundärstruktur:

a) Nach den Daten von Chou und Fasman, (1974a, 1974b):

α -Helix in Positionen 10-14/15, 28-49 und 55-65 .

β -Struktur in Positionen 14-24, 50-54/55, 76-85 und 98-101 .

b) Nach den Daten von Burgess et al. (1974):

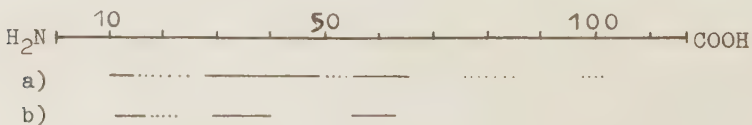
α -Helix in Positionen 11-17, 30-40 und 55-62 .

β -Struktur in Positionen 18-22 .

Ein Vergleich der nach den beiden Methoden gewonnenen Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins S13 zeigt große Übereinstimmungen (Abbildung 21). Der Unterschied liegt im wesentlichen darin, daß nach der Methode von Chou und Fasman drei zusätzliche Bereiche mit β -Struktur postuliert werden. Der α -Helix-Gehalt im Protein S13 dürfte damit etwa 23% betragen, der Gehalt an β -Struktur mindestens etwa 4%.

Abbildung 21: Sekundärstruktur des Proteins S13

— α -Helix β -Struktur



13. Sequenzvergleich mit anderen ribosomalen Proteinen

Bei einem Vergleich der Sequenz von S13 mit den bisher bekannten Sequenzen anderer ribosomaler Proteine von *E. coli* lassen sich insgesamt 58 identische Tripeptide (Tabelle 7) und 9 identische Tetrapeptide (Tabelle 8) feststellen; größere identische Peptide treten nicht auf. Das relativ geringe Maß an Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen entspricht einer zufallsbedingten Homologie (Wittmann-Liebold und Dzionara, 1976).

Ein auffallend hoher Grad an Homologie ist allerdings feststellbar, wenn man den N-terminalen Bereich von S13 mit dem des ribosomalen Proteins S14 von *Bacillus stearothermophilus* vergleicht (Yaguchi et al., 1974), was auf eine enge Verwandtschaft zwischen den beiden Proteinen hinweist (homologe Proteine):

E.coli		5		10		15
S13	Ala-Arg-Ile-Ala-Gly	Ile-Asn-Ile-Pro	Asp-His-Lys	His-Ala-Val		
S14	Ala-Arg-Ile-Ala-Gly	Val-Asp-Ile-Pro	Arg-Asp-Lys	Arg-Val-Val		
B.stearo		5		10		15

Tabelle 7: Identische Tripeptide

Ala-Arg-Ile	S13	1-3	L18	6-8				
Ala-Gly-Ile	S13	4-6	S13	36-38				
Gly-Ile-Asn	S13	5-7	L24	37-39				
Lys-His-Ala	S13	12-14	S6	93-95				
His-Ala-Val	S13	13-15	S6	94-96				
Ala-Val-Ile	S13	14-16	S6	83-85	L7/12	67-69	L20	37-39
Val-Ile-Ala	S13	15-17	L18	39-41	L20	7-9	L32	53-55
Ile-Ala-Leu	S13	16-18	L1	26-28				
Ala-Leu-Thr	S13	17-19	L32	20-22				
Ile-Tyr-Gly	S13	21-23	S4	63-65	S17	32-34	L25	30-32
Tyr-Gly-Val	S13	22-24	S4	50-52	S4	64-66		
Gly-Val-Gly	S13	23-25	L5	38-40				
Val-Gly-Lys	S13	24-26	L3	5-7	L18	74-76		
Gly-Lys-Thr	S13	25-27	L13	22-24				
Thr-Arg-Ser	S13	27-29	L30	9-11	L32	8-10		
Arg-Ser-Lys	S13	28-30	L32	9-11				
Lys-Ala-Ile	S13	30-32	L18	56-58	S4	119-121		
Leu-Ala-Ala	S13	33-35	L5	56-58	L5	169-171	L10	155-157
							L16	119-121
Ala-Ala-Ala	S13	34-36	S20	44-46	L5	52-54	L7/12	34-36
	L10	91-93	L18	70-72	L10	110-112	L7/12	35-37
	L18	71-73			L16	120-122		
Ala-Ala-Gly	S13	35-37			L7/12	60-62	L7/12	41-43
Ile-Ala-Glu	S13	38-40	L18	58-60				
Ser-Glu-Leu	S13	45-47	S9	95-97				
Glu-Gly-Gln	S13	49-51			L10	114-116		
Gln-Ile-Asp	S13	51-53			L10	122-124		
Ile-Asp-Thr	S13	52-54	S4	27-29				
Thr-Leu-Arg	S13	54-56	L5	89-91				
Asp-Glu-Val	S13	57-59	L5	9-11	L24	8-10		
Glu-Val-Ala	S13	58-60	L10	16-18				
Val-Ala-Lys	S13	59-61	S12	15-17	L10	17-19	L23	34-36
Ala-Lys-Phe	S13	60-62	S7	23-25	L1	35-37	L10	104-106
Lys-Phe-Val	S13	61-63	S7	24-26	L1	36-38		
Val-Val-Glu	S13	63-65			L7/12	19-21		
Val-Glu-Gly	S13	64-66	S8	50-52	L10	63-65	L24	35-37
Glu-Gly-Asp	S13	65-67	S8	51-53				
Leu-Arg-Arg	S13	68-70	S15	85-87	S21	15-17	L10	59-61
	L30	28-30						

Tabelle 7 (Fortsetzung)

Arg-Arg-Glu	S13	69-71	S4	12-14	S6	109-111	S21	33-35
Glu-Ile-Ser	S13	71-73	S8	72-74				
Ile-Lys-Arg	S13	76-78	S18	58-60				
Lys-Arg-Leu	S13	77-79	L27	18-20				
Arg-Leu-Met	S13	78-80	L10	138-140				
Tyr-Arg-Gly	S13	85-87	L32	48-50				
Arg-Gly-Leu	S13	86-88	S13	92-94	S15	52-54	L5	114-116
	L5	149-151	L16	18-20				
Gly-Leu-Arg	S13	87-89	S8	81-83	S9	116-118	S15	84-86
	L30	27-29						
Leu-Arg-His	S13	88-90	L32	38-40				
Arg-His-Arg	S13	89-91	L17	2-4				
Arg-Arg-Gly	S13	91-93	S15	51-53				
Val-Arg-Gly	S13	96-98	L5	148-150	L7/12	72-74		
Arg-Gly-Gln	S13	97-99	L5	91-93				
Gly-Gln-Arg	S13	98-100	L5	92-94				
Arg-Thr-Lys	S13	100-102	S6	91-93	L16	6-8	L33	27-29
Thr-Lys-Thr	S13	101-103	L16	132-134				
Asn-Ala-Arg	S13	104-106	S21	63-65				
Arg-Thr-Arg	S13	106-108	S21	66-68				
Lys-Gly-Pro	S13	109-111	S19	6-8	L27	71-73		
Arg-Lys-Pro	S13	112-114	S4	43-45	S4	181-183	S12	8-10
Lys-Pro-Ile	S13	113-115	L16	71-73				
Pro-Ile-Lys	S13	114-116	L16	125-127				
Ile-Lys-Lys	S13	115-117	S20	31-33				

Tabelle 8: Identische Tetrapeptide

Lys-His-Ala-Val	S13	12-15	S6	93-96		
Ile-Tyr-Gly-Val	S13	21-24	S4	63-66		
Thr-Arg-Ser-Lys	S13	27-30	L32	8-11		
Leu-Ala-Ala-Ala	S13	33-36	L16	119-122		
Glu-Val-Ala-Lys	S13	58-61	L10	16-19		
Ala-Lys-Phe-Val	S13	60-63	S7	23-26	L1	35-38
Val-Glu-Gly-Asp	S13	64-67	S8	50-53		
Arg-Arg-Gly-Leu	S13	91-94	S15	51-54		
Arg-Gly-Gln-Arg	S13	97-100	L5	91-94		

Literaturangaben zu den Tabellen 7 und 8

Protein	Literatur
S4	Reinbolt und Schiltz (1973)
S6	Hitz et al. (1975)
S7	Wittmann und Wittmann-Liebold (1974)
S8	Stadler und Wittmann-Liebold (1975)
S9	Chen und Wittmann-Liebold (1975)
S12	Wittmann und Wittmann-Liebold (1974)
S15	Morinaga et al. (1976)
S17	Wittmann und Wittmann-Liebold (1974)
S18	Yaguchi (1975)
S19	Wittmann und Wittmann-Liebold (1974)
S20	Wittmann-Liebold et al. (1976)
S21	Vandekerckhove et al. (1975)
L1	Wittmann-Liebold et al. (1975a)
L3	Wittmann-Liebold et al. (1975a)
L5	Chen und Ehrke (1976)
L7/12	Terhorst et al. (1973)
L10	Heiland et al. (1976)
L13	Wittmann-Liebold et al. (1975a)
L16	Brosius und Chen (1976)
L17	Wittmann-Liebold et al. (1975a)
L18	Brosius et al. (1975)
L20	Wittmann-Liebold et al. (1975a)
L23	Wittmann-Liebold et al. (1975a)
L24	Wittmann-Liebold et al. (1975a)
L25	Bitar und Wittmann-Liebold (1975)
L27	Chen et al. (1975)
L30	Ritter und Wittmann-Liebold (1975)
L32	Wittmann-Liebold et al. (1975b)
L34	Wittmann-Liebold und Pannenbecker (1976)

D. Diskussion

1. Proteinsequenz

Stärkster limitierender Faktor für die Sequenzarbeit an S13 war die begrenzte Menge an Protein, die zur Verfügung stand.

Dementsprechend wurden stets Spaltungsmethoden gesucht und angewendet, die zu möglichst günstigen Peptiden hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung und der Größe führten.

Bei der tryptischen Spaltung stellte sich die Zuordnung der vielen Di- und Tripeptide als relativ schwierig heraus, und die Spaltung mit *Staphylococcus aureus* Protease wiederum lieferte neben sechs sehr gut sequenzierbaren Peptiden zwei große Peptide mit 40 bzw. 36 Aminosäureresten (SP 1 und SP 8). Die Hoffnung, durch Spaltung mit Bromcyan das Protein in wenige große Bruchstücke zerlegen und diese dann mit dem Proteinsequenator sequenzieren zu können, hatte sich nicht erfüllt, was durch die äußerst niedrige Ausbeute an Spaltprodukten und deren schwierige Reinigung bedingt war. So blieb nur der mühevollere Weg über die Isolierung und teilweise Sequenzierung der Thermolysin-Peptide.

Die im Proteinsequenator ermittelte Sequenz des Proteins im N-terminalen Bereich stimmte bis zur Position 39 mit der tatsächlichen Sequenz lückenlos überein; die Abweichungen der früher publizierten von der tatsächlichen Sequenz bei den Positionen 40 bis 60 liegen in den damals vorhandenen schlechteren apparativen Möglichkeiten begründet.

Die aufgestellte Sequenz für das ribosomale Protein S13 stimmt sehr gut mit den Werten aus der Bruttoanalyse überein. Nur der Wert für Glx ist um ca. 10% zu hoch, wahrscheinlich durch leichte

Verunreinigung mit Protein S9 bedingt, das einen relativ hohen Gehalt an Glx hat (Chen und Wittmann-Liebold, 1975). Der Wert für Ile liegt etwas zu niedrig, was auf eine unvollständige Hydrolyse von sehr schwer spaltbaren Peptidbindungen, zum Beispiel von Ile-Leu (Position 32-33), zurückzuführen ist. In dem etwas zu hohen Wert für Leu ist wahrscheinlich das Dipeptid Ile-Leu mit enthalten. Das Vorhandensein eines Cysteinrestes war schon mehrfach durch chemische Untersuchungen festgestellt worden (Bakardjewa und Crichton, 1974 ; Moore, 1975 ; Cronenberger und Erdmann, 1975 ; Acharya und Moore, 1973).

Gleichzeitig wurde festgestellt, daß die SH-Gruppe im Protein S13 für die Aktivität des Ribosoms nicht wesentlich ist (Kahan et al., 1974). Die Modifizierung der SH-Gruppen von S13 und S18 mit N-Äthylmaleimid führt dazu, daß die Assoziation der kleinen ribosomalen Untereinheit mit der großen nicht mehr stattfindet (Ginzburg und Zamir, 1975). Die SH-Gruppe in S13 reagiert innerhalb des 70S Partikels in geringerem Maße mit N-Äthylmaleimid als innerhalb der 30S Untereinheit (Ginzburg und Zamir, 1976).

Moore und Crichton (1973) haben gezeigt, daß am isolierten Protein S13 27% der Lysine reduktiv methyliert werden können; am S13 innerhalb der 30S Untereinheit sind es jedoch nur 11%.

Ähnliche Resultate erbrachten Phosphorylierungsversuche an 30S Untereinheiten und an 70S Partikeln (Issinger et al., 1975), wobei das Protein S13 zwar in der 30S Untereinheit nicht jedoch im 70S Partikel phosphoryliert wird. Michalski und Sells (1974) zeigten, daß das Protein S13 bei 37°C viel stärker jodiert wird als bei 0°C, was auf eine temperaturbedingte Konformationsänderung bei der 30S Untereinheit hindeutet.

Generell lassen sich aus diesen Versuchen die folgenden Schlüsse ziehen: 1) Das Protein S13 ist innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheit gegen chemische Agentien geschützter als im isolierten Zustand. 2) Es ist innerhalb des 70S Partikels geschützter als in der 30S Untereinheit.

Es ist interessant, daß kürzlich die Bindung des Proteins S13 an die 3'-terminale Hälfte der ribosomalen 16SRNS gezeigt werden konnte (Hochkeppel et al., 1976). Es erscheint möglich, daß der extrem basische C-terminale Bereich des Proteins (Positionen 86-117) bei dieser Bindung eine Rolle spielt.

2. Topographie

Die Lage von S13 in der 30S ribosomalen Untereinheit von E. coli konnte mit Hilfe der Immun-Elektronenmikroskopie bestimmt werden (Tischendorf et al., 1974; Tischendorf et al., 1975; Lake und Kahan, 1975). Es liegt an der Spitze des "Kopfes" der 30S Untereinheit in unmittelbarer Nachbarschaft von S14. Huang et al. (1975) konnten mit einer Fluoreszenz-Technik die Abstände zwischen S13 und den Proteinen S4, S16/17, S19 und S20 abschätzen.

Das Protein S13 konnte auch mit Hilfe verschiedener bifunktionaler Reagenzien mit den Proteinen S4 und S19 quervernetzt werden (Sommer und Traut, 1974; Sun et al., 1974; Lutter et al., 1974). Das deutet darauf hin, daß diese Proteine zumindest in einigen Bereichen benachbart sind. Die enge Nachbarschaft zur 16S RNS konnte durch Quervernetzungsversuche gezeigt werden (Lindemann, 1974), und sie wurde durch die gefundene Bindung von S13 an die 16S RNS (Hochkeppel et al., 1976) sowie durch die Isolierung von Ribonukleoprotein-Fragmenten mit Spuren von S13 (Morgan und Brimacombe, 1973; Rinke et al., 1976) bestätigt.

3. Funktionelle Aspekte

Über die Rolle von S13 bei der Ribosomenfunktion gibt es einige Befunde:

Zunächst einmal konnten Lelong et al. (1974) durch Hemmversuche mit Antikörpern feststellen, daß S13 eine Rolle bei der Initiation spielt. Bestätigt wurde dieser Befund durch die Quervernetzung von S13 mit den Initiationsfaktoren IF-2 und IF-3 (Traut et al., 1974; Bollen et al., 1975). Pongs et al. (1975) zeigten eine schwache Reaktion von S13 mit einem Derivat des AUG-Tripletts, dem Initiationscodon, was auf eine Nachbarschaft von S13 zur Codon-Bindungsstelle hinweist. Christiansen und Nierhaus (1976) berichteten kürzlich von einer bemerkenswerten Stimulierung der Stringent-Faktor abhängigen Synthese von Guanosintetra- und Guanosinpentaphosphat durch S13.

E. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Primärstruktur des ribosomalen Proteins S13 von *Escherichia coli* bestimmt.

Die Aminosäuresequenz vom N-Terminus des Proteins bis zur Position 60 war mit dem Proteinsequenator ermittelt worden, und sie konnte durch die Isolierung und Sequenzierung der entsprechenden tryptischen Peptide größtenteils bestätigt werden. Zur Bestimmung der Primärstruktur für die Positionen 61-117 wurden verschiedene spezifische Spaltungsmethoden angewendet. Die resultierenden Peptide wurden säulen- und dünnenschichtchromatographisch getrennt und mit der Dansyl-Edman Methode beziehungsweise mit dem Festphasen-Peptidsequenator sequenziert. Durch die Kombination der Sequenzen einander überlappender Peptide konnte schließlich die Gesamtsequenz des Proteins eindeutig erstellt werden.

Unter Anwendung zweier verschiedener Methoden wurden Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins gemacht. Es ergab sich ein α -Helix-Anteil von etwa 23%, während die Angaben über den Gehalt an β -Struktur divergierten.

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz von S13 mit den bekannten Sequenzen anderer ribosomaler Proteine von *E. coli* ließ sich nur ein geringer Grad an Übereinstimmung feststellen: Neun Tetrapeptide und 58 Tripeptide waren zwischen S13 und anderen Proteinen identisch. Es traten keine identischen Peptide mit mehr als vier Aminosäuren auf.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit wurde zusammen mit den bisher publizierten Daten über die Lage von S13 in der 30S Untereinheit und über die Rolle von S13 bei der Ribosomenfunktion diskutiert.

F. Literaturverzeichnis

- Acharya, A.S. & Moore, P.B.: "Reaction of Ribosomal Sulfhydryl Groups with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)".
J.Mol.Biol. 76 , 207-221 (1973)
- Bakardjieva, A. & Crichton, R.R.: "Topography of Escherichia coli Ribosomal Proteins. The Order of Reactivity of Thiol Groups".
Biochem.J. 143 , 599-606 (1974)
- Barritault, D., Expert-Besançon, A., Guérin, M.-F. & Hayes, D.: "The Use of Acetone Precipitation in the Isolation of Ribosomal Protein".
Eur.J.Biochem. 63 , 131-135 (1976)
- Bitar, K.G. & Wittmann-Liebold, B.: "The Primary Structure of the 5S RNA Binding Protein L25 of Escherichia coli Ribosomes".
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356 , 1343-1352 (1975)
- Bollen, A., Heimark, R.L., Cozzzone, A., Traut, R.R. & Hershey, J.W.B.: "Cross-Linking of Initiation Factor IF-2 to Escherichia coli 30S Ribosomal Proteins with Dimethylsuberimidate".
J.Biol.Chem. 250 , 4310-4314 (1975)
- Brosius, J. & Chen, R.: "The Primary Structure of Protein L16 Located at the Peptidyltransferase Center of Escherichia coli Ribosomes".
FEBS Lett. 68 , 105-109 (1976)
- Brosius, J., Schiltz, E. & Chen, R.: "The Primary Structure of the 5S RNA Binding Protein L18 from Escherichia coli Ribosomes".
FEBS Lett. 56 , 359-361 (1975)
- Burgess, A.W., Ponnuswamy, P.K. & Sheraga, H.A.: "Analysis of Conformations of Amino Acid Residues and Prediction of Backbone Topography in Proteins". Israel J.Chem. 12 , 239-286 (1974)
- Chen, R. & Ehrke, G.: "The Primary Structure of the 5S RNA Binding Protein L5 of Escherichia coli Ribosomes". FEBS Lett. 69 , 240-245 (1976)
- Chen, R., Mende, L. & Arfsten, U.: "The Primary Structure of Protein L27 from the Peptidyl-tRNA Binding Site of Escherichia coli Ribosomes".
FEBS Lett. 59 , 96-99 (1975)
- Chen, R. & Wittmann-Liebold, B.: "The Primary Structure of Protein S9 from the 30S Subunit of Escherichia coli Ribosomes".
FEBS Lett. 52 , 139-140 (1975)

- Chou, P.Y. & Fasman, G.D.: "Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, β -Sheet and Random Coil Regions Calculated from Proteins". *Biochemistry* 13 , 211-222 (1974a)
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D.: "Prediction of Protein Conformation". *Biochemistry* 13 , 222-244 (1974b)
- Christiansen, L. & Nierhaus, K.H.: "Ribosomal proteins of *Escherichia coli* that stimulate stringent-factor-mediated pyrophosphoryl transfer in vitro". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73 , 1839-1843 (1976)
- Cronenberger, J.H. & Erdmann, V.A.: "Stimulation of Polypeptide Polymerization by Blocking of Free Sulphydryl Groups in *Escherichia coli* Ribosomal Proteins". *J. Mol. Biol.* 95 , 125-127 (1975)
- Dzionara, M., Kaltschmidt, E. & Wittmann, H.G.: "Ribosomal Proteins XIII. Molecular Weights of Isolated Ribosomal Proteins of *Escherichia coli*". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67 , 1909-1913 (1970)
- Edman, P.: "Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides". *Acta Chem. Scan.* 4 , 283-293 (1949)
- Edman, P. & Begg, G.: "A Protein Sequenator". *Eur. J. Biochem.* 1 , 80-91 (1967)
- Fontana, A.: "Modification of Tryptophan with BNPS-Skatole (2-(2-Nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3-bromoindolenine)". *Methods in Enzymology* XXV , 419-423 (1972)
- Ginzburg, I. & Zamir, A.: "Characterization of Different Conformational Forms of 30S Ribosomal Subunits in Isolated and Associated States: Possible Correlations Between Structure and Function". *J. Mol. Biol.* 93 , 465-476 (1975)
- Ginzburg, I. & Zamir, A.: "Functional Roles and Interactions of Sulphydryl Proteins of 30S Ribosomal Subunits". *J. Mol. Biol.* 100 , 387-398 (1976)
- Goodwin, T.W. & Morton, R.A.: "Spectrophotometric Estimation of Tryptophan" in: "Protein Sequence Determination" (Needleman, S.B.) 2. Aufl., Seite 167-168 , Springer-Verlag Berlin (1975)
- Gross, E.: "The Cyanogen Bromide Reaction". *Methods in Enzymology* XI , 238-255 (1967)

Hartley, B.S.: "Strategy and Tactics in Protein Chemistry".
Biochem. J. 119 , 805-816 (1970)

Heiland, I., Brauer, D. & Wittmann-Liebold, B.: "Primary Structure of Protein L10 from the Large Subunit of Escherichia coli Ribosomes". Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., im Druck

Hirs, C.H.W.: "The Oxidation of Ribonuclease with Performic Acid".
J. Biol. Chem. 219 , 611-621 (1956)

Hitz, H., Schäfer, D. & Wittmann-Liebold, B.: "Primary Structure of Ribosomal Protein S6 from the Wild Type and a Mutant of Escherichia coli". FEBS Lett. 56 , 259-262 (1975)

Hochkeppel, H.-K., Spicer, E. & Craven, G.R.: "A Method of Preparing Escherichia coli 16S RNA Possessing Previously Unobserved 30S Ribosomal Protein Binding Sites". J. Mol. Biol. 101 , 155-170 (1976)

Houmard, J. & Drapeau, G.R.: "Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme Specific for Glutamoyl Bonds". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 , 3506-3509 (1972)

Huang, K.-H., Fairclough, R.H. & Cantor, C.R.: "Singlet Energy Transfer Studies of the Arrangement of Proteins in the 30S Escherichia coli Ribosome". J. Mol. Biol. 97 , 443-470 (1975)

Issinger, O.-G., Kiefer, M.C. & Traut, R.R.: "Specificity of ATP-Dependent and GTP-Dependent Protein Kinases with Respect to Ribosomal Proteins of Escherichia coli".
Eur. J. Biochem. 59 , 137-143 (1975)

Kahan, L., Held, W.A. & Nomura, M.: "Effects of Aminoethylation of Cysteine Residues on the Structural and Functional Activities of the Escherichia coli 30S Ribosomal Proteins". J. Mol. Biol. 88 , 797-808 (1974)

Kaltschmidt, E. & Wittmann, H.G.: "Ribosomal Proteins VII. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins". Analyt. Biochem. 36 , 401-412 (1970)

Lake, J.A. & Kahan, L.: "Ribosomal Proteins S5, S11, S13 and S19 Localized by Electron Microscopy of Antibody-labeled Subunits". J. Mol. Biol. 99 , 631-644 (1975)

Laursen, R.A.: "Solid Phase Edman Degradation. An Automatic Peptide Sequencer". *Eur.J.Biochem.* 20 , 89-102 (1971)

Lelong, J.C., Gros, D., Gros, F., Bollen, A., Maschler, R. & Stöffler, G.: "Function of Individual 30S Subunit Proteins of *Escherichia coli*. Effect of Specific Immunoglobulin Fragments (Fab) on Activities of Ribosomal Decoding Sites". *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 71 , 248-252 (1974)

Lindemann, H.: "Versuche zur Quervernetzung von Proteinen und Nukleinsäuren am Ribosom von *Escherichia coli*". Diplomarbeit Fachbereich 23 (Biologie) der Freien Universität Berlin (1974)

Lutter, L.C., Bode, U. & Kurland, C.G.: "Ribosomal Protein Neighbourhoods III. Cooperativity of Assembly". *Molec.Gen.Genet.* 129 , 167-176 (1974)

Michalski, C.J. & Sells, B.H.: "Molecular Morphology of Ribosomes. Structural Considerations of *Escherichia coli* Ribosomal Subunits Utilizing Lactoperoxidase-Catalyzed Iodination of Ribosomal Proteins". *Eur.J.Biochem.* 49 , 361-367 (1974)

Moore, G. & Crichton, R.R.: "Reductive Alkylation of Ribosomes as a Probe to the Topography of Ribosomal Proteins". *Biochem.J.* 143 , 607-612 (1974)

Moore, P.B.: "The Distribution of Half-cystine in the Ribosomal Proteins of *Escherichia coli*". *J.Mol.Biol.* 98 , 439-444 (1975)

Morgan, J. & Brimacombe, R.: "A Preliminary Three-Dimensional Arrangement of the Proteins in the *Escherichia coli* 30S Ribosomal Sub-Particle". *Eur.J.Biochem.* 37 , 472-480 (1973)

Morinaga, T., Funatsu, G., Funatsu, M. & Wittmann, H.G.: "Primary Structure of the 16S RNA Binding Protein S15 from *Escherichia coli* Ribosomes". *FEBS Lett.* 64 , 307-309 (1976)

Nierhaus, K. & Weber, J.: "Struktur und Funktion der Ribosomen". *Umschau* 72 , 346-352 (1972)

Pathy, L. & Smith, E.L.: "Reversible Modification of Arginine Residues. Application to Sequence Studies by Restriction of Tryptic Hydrolysis to Lysine Residues".

J.Biol.Chem. 250 , 557-564 (1975)

- Pongs, O., Stöffler, G. & Lanka, E.: "The Codon Binding Site of the Escherichia coli Ribosome as Studied with a Chemically Reactive A-U-G Analog". J.Mol.Biol. 99 , 301-315 (1975)
- Reinbolt, J. & Schiltz, E.: "The Primary Structure of Ribosomal Protein S4 from Escherichia coli". FEBS Lett. 36 , 250-252 (1973)
- Rinke, J., Yuki, A. & Brimacombe, R.: "Studies on the Environment of Protein S7 within the 30S Subunit of Escherichia coli Ribosomes". Eur.J.Biochem. 54 , 77-89 (1976)
- Ritter, E. & Wittmann-Liebold, B.: "The Primary Structure of Protein L30 from Escherichia coli Ribosomes". FEBS Lett. 60 , 153-155 (1975)
- Sommer, A. & Traut, R.R.: "Diagonal Polyacrylamide-Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis for the Identification of Ribosomal Proteins Crosslinked with Methyl-4-Mercaptobutyrimide". Proc.Nat.Acad.Sci.USA 71 , 3946-3950 (1974)
- Spande, T.F., Witkop, B., Degani, Y. & Patchornik, A.: "Selective Cleavage and Modification of Peptides and Proteins". Adv.Prot.Chem. 24 , 159 (1970)
- Stadler, H. & Wittmann-Liebold, B.: "Determination of the Amino Acid Sequence of the Ribosomal Protein S8 of Escherichia coli". Eur.J.Biochem. 66 , 49-56 (1976)
- Sun, T.-T., Bollen, A., Kahan, L. & Traut, R.R.: "Topography of Ribosomal Proteins of the Escherichia coli 30S Subunit as Studied with the Reversible Cross-Linking Reagent Methyl-4-Mercaptobutyrimide". Biochemistry 13 , 2334-2340 (1974)
- Terhorst, C., Möller, W., Laursen, R. & Wittmann-Liebold, B.: "Amino Acid Sequence of a 50S Ribosomal Protein Involved in Both EF-G and EF-T dependent GTP-Hydrolysis". FEBS Lett. 28 , 325-328 (1972)
- Tischendorf, G.W., Zeichhardt, H. & Stöffler, G.: "Location of Proteins S5, S13 and S14 on the Surface of the 30S Ribosomal Subunit from Escherichia coli as Determined by Immune Electron Microscopy". Molec.Gen.Genet. 134 , 209-223 (1974)
- Tischendorf, G.W., Zeichhardt, H. & Stöffler, G.: "Architecture of the Escherichia coli Ribosome as Determined by Immune Electron Microscopy". Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72 , 4820-4824 (1975)

Traut, R.R., Heimark, R.L., Sun, P.-P., Hershey, J.W.B. & Bollen, A.:
"Protein Topography of Ribosomal Subunit from *Escherichia coli*".
in: "Ribosomes" (Nomura, Tissières & Lengyel, Hsg), Cold Spring
Harbour Laboratory, New York, USA; 271-308 (1974)

Tschesche, H. & Kupfer, S.: "C-Terminal Sequence Determination by
Carboxypeptidase C from Orange Leaves".
Eur. J. Biochem. 26 , 33-36 (1972)

Vandekerckhove, J., Rombauts, W., Peeters, B. & Wittmann-Liebold, B.:
Determination of the Complete Amino Acid Sequence of Protein S21
from *Escherichia coli* Ribosomes".
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356 , 1955-1976 (1975)

Weber, K. & Osborn, M.: "The Reliability of Molecular Weight
Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis".
J. Biol. Chem. 244 , 4406-4412 (1969)

Wittmann, H.G. & Wittmann-Liebold, B.: "Chemical Structure of
Bacterial Ribosomal Proteins". in: "Ribosomes" (Nomura, Tissières &
Lengyel, Hsg), Cold Spring Harbour Laboratory, New York, USA;
115-140 (1974)

Wittmann-Liebold, B.: "Amino Acid Composition of the Tryptic Peptides
Isolated from Proteins S4, S18 and S20 of *Escherichia coli*
Ribosomes". Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 , 1705-1714 (1971)

Wittmann-Liebold, B.: "Studies on the Primary Structure of 20
Proteins from *Escherichia coli* Ribosomes by Means of an Improved
Protein Sequenator". FEBS Lett. 36 , 247-249 (1973a)

Wittmann-Liebold, B.: "Amino Acid Sequence Studies on ten Ribosomal
Proteins of *Escherichia coli* with an Improved Sequenator Equipped
with an Automatic Conversion Device".
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354 , 1415-1431 (1973b)

Wittmann-Liebold, B. & Lehmann, A.: "Comparison of Various Techniques
Applied to the Amino Acid Sequence Determination of Ribosomal
Proteins". in: "Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis"
(Laursen, R.A., Hsg), Pierce Chemical Company, Rockford, USA
81-90 (1975)

Wittmann-Liebold, B., Geissler, A.W. & Marzinzig, E.: "Studies on the Primary Structure of 14 Proteins from the Large Subunit of Escherichia coli Ribosomes with an Improved Protein Sequenator and with Mass Spectrometry". J. Supramol. Struct. 3, 426-447 (1975a)

Wittmann-Liebold, B., Greuer, B. & Pannenbecker, R.: "The Primary Structure of Protein L32 from the 50S Subunit of Escherichia coli Ribosomes". Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1977-1979 (1975b)

Wittmann-Liebold, B. & Dzionara, M.: "Studies on the Significance of Sequence Homologies among Proteins from Escherichia coli Ribosomes". FEBS Lett. 65, 281-283 (1976)

Wittmann-Liebold, B., Marzinzig, E. & Lehmann, A.: "Primary Structure of Protein S20 from the Small Ribosomal Subunit of Escherichia coli". FEBS Lett. 68, 110-114 (1976)

Wittmann-Liebold, B. & Pannenbecker, R.: "Primary Structure of Protein L33 from the Large Subunit of the Escherichia coli Ribosome". FEBS Lett. 68, 115-118 (1976)

Yaguchi, M., Matheson, A.L. & Visentin, L.P.: "Prokaryotic Ribosomal Proteins: N-terminal Sequence Homologies and Structural Correspondence of 30S Ribosomal Proteins from Escherichia coli and Bacillus stearothermophilus". FEBS Lett. 46, 296-300 (1974)

Yaguchi, M.: "Primary Structure of Protein S18 from the Small Escherichia coli Ribosomal Subunit". FEBS Lett. 59, 217-220 (1975)

G. Anmerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. H.G. Wittmann und Frau Dr. B. Wittmann-Liebold am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem angefertigt.

Mein Dank gebührt Frau Dr. B. Wittmann-Liebold für die freundliche Unterstützung und den Herren Kamp, Franz und Lehmann für deren technische Assistenz.

H. Lebenslauf

Am 1. Oktober 1949 wurde ich, Harald Axel Lindemann, als Sohn des Steinsetzmeisters Günter Nitze und der Kontoristin Gertrud Schmöker, geborene Lindemann, verwitwet seit dem 13.4.1945, in Berlin-Kreuzberg geboren.

In Berlin-Kreuzberg besuchte ich von 1956-1962 die Grundschule und von 1962-1969 das Leibniz-Gymnasium, wo ich im Frühjahr 1969 die Reifeprüfung mit Erfolg ablegte. Im Sommersemester 1969 wurde ich an der Freien Universität Berlin für das Studium der Allgemeinen Biologie und Genetik immatrikuliert. Nach der Vorprüfung zur Diplomprüfung im Frühjahr 1971 bestand ich die Diplomhauptprüfung für Biologen im Januar 1974.

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von mir unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann und Frau Dr. B. Wittmann-Liebold am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem in der Zeit vom Februar 1974 bis November 1976 angefertigt.

